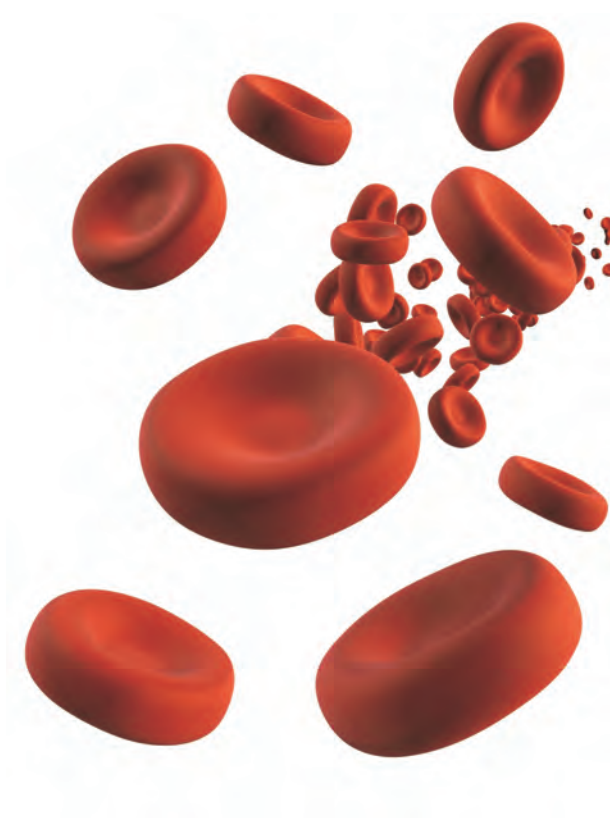


# Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex pocH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Katze

**Julia Nakagawa**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,  
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

**Evaluation der Hämatologiesysteme  
Sysmex pocH-100iV Diff und XT-2000iV  
für die Tierart Katze**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Julia Nakagawa**  
Tierärztin aus Tokio

Giessen, 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

---

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Andreas Moritz

Dr. Klaus Failing

Tag der Disputation:

14.06.2010

## **Meinen Eltern**



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>LITERATURÜBERSICHT</u></b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>EVALUATION VON MESSGERÄTEN</b>	<b>2</b>
2.1.1	PRÜFUNG DER LINEARITÄT	4
2.1.2	WIEDERHOLUNGSEXPERIMENT	4
2.1.3	ANTIKOAGULANZ	5
2.1.4	ALTERUNG UND LAGERUNG DER BLUTPROBE	6
2.1.5	CARRY-OVER	6
2.1.6	METHODENVERGLEICH	6
<b>2.2</b>	<b>BLUTZELLANALYSE</b>	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>AUTOMATISCHE MESSUNG VON BLUTPROBEN</b>	<b>10</b>
2.3.1	WIDERSTANDSMESSUNG	10
2.3.2	QUANTITATIVE BUFFY-COAT-ANALYSE	11
2.3.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	11
<b>2.4</b>	<b>SYSMEX POCH-100iV DIFF</b>	<b>12</b>
2.4.1	HÄMOGLOBINMESSUNG	13
2.4.2	HÄMATOKRITBESTIMMUNG	14
2.4.3	HISTOGRAMM	15
<b>2.5</b>	<b>SYSMEX XT-2000iV</b>	<b>17</b>
2.5.1	MESSPRINZIP DER ERYTHROZYTEN UND THROMBOZYTEN	17
2.5.2	HÄMOGLOBINMESSUNG	18
2.5.3	DIFF-KANAL	19
2.5.4	WBC/BASO-KANAL	21
2.5.5	RETIKULOZYTEN- UND THROMBOZYTENANALYSE	21
<b>2.6</b>	<b>SIEMENS ADVIA 2120</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>BESONDERHEITEN BEI DER BLUTZELLANALYSE DER KATZE</b>	<b>26</b>
2.7.1	THROMBOZYTEN	26
2.7.2	RETIKULOZYTEN	27
<b>2.8</b>	<b>ZIEL DER STUDIE</b>	<b>28</b>



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
3.1	BLUTPROBEN	29
3.2	PROBENVERARBEITUNGEN	29
3.3	STUDIENPROTOKOLL	32
3.3.1	METHODENVERGLEICH	32
3.3.2	PRÄZISION INNERHALB EINER SERIE	32
3.3.3	LINEARITÄT UND VERSCHLEPPUNG	33
3.3.4	ANTIKOAGULANZVERGLEICH	33
3.3.5	BLUTALTERUNG UND LAGERUNGSTEMPERATUR	34
3.4	STATISTIK	34
3.4.1	ZELLZÄHLUNG	34
3.4.2	DIFFERENTIALBLUTBILD	35
3.4.3	RETIKULOZYTENZÄHLUNG	35
3.4.4	PRÄZISION INNERHALB EINER SERIE	36
3.4.5	LINEARITÄT UND VERSCHLEPPUNG	36
3.4.6	ANTIKOAGULANZVERGLEICH	36
3.4.7	BLUTALTERUNG UND LAGERUNGSTEMPERATUR	37
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
4.1	PRÄZISIONSMESSUNG	38
4.1.1	BLUTZELLZÄHLUNG	38
4.1.2	BLUTZELLDIFFERENZIERUNG	40
4.1.3	RETIKULOZYTENZÄHLUNG	44
4.2	VERSCHLEPPUNG	45
4.3	LINEARITÄT	45
4.4	METHODENVERGLEICH	46
4.4.1	ZELLZÄHLUNG	46
4.4.2	DIFFERENTIALBLUTBILD	51
4.4.3	RETIKULOZYTENZÄHLUNG	54
4.5	ANTIKOAGULANZVERGLEICH	56
4.6	LAGERUNGS- UND VERLAUFSUNTERSUCHUNGEN	58
4.6.1	ZELLZÄHLUNG XT-2000iV	58
4.6.2	ZELLZÄHLUNG POCH-100iV DIFF	65

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.6.3	DIFFERENTIALBLUTBILD XT-2000iV	69
4.6.4	RETIKULOZYTEN IM XT-2000iV	72
<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>74</b>
5.1	PRÄZISION, LINEARITÄT UND VERSCHLEPPUNG	74
5.2	METHODENVERGLEICH	77
5.3	ZELLZÄHLUNG	80
5.4	DIFFERENTIALBLUTBILD	89
5.4.1	DIFFERENTIALBLUTBILD DES XT-2000iV	90
5.4.2	DIFFERENTIALBLUTBILD DES POCH-100iV DIFF	100
5.5	RETIKULOZYTENZÄHLUNG	102
5.6	ANTIKOAGULANZVERGLEICH	105
5.7	VERLAUFSUNTERSUCHUNGEN	106
5.8	GERÄTEBEDIENUNG	111
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>125</b>
<b>11</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>132</b>



### 1 Einleitung

Vor über einem halben Jahrhundert gelang Coulter durch die Erfindung des Coultercounters der Durchbruch zur automatischen Quantifizierung von Blutzellen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden Geräte basierend auf demselben Prinzip der Impedanzmessung hergestellt.

Eine hämatologische Untersuchung wird mittlerweile auch zur Routinediagnostik in der Veterinärmedizin gezählt. Eine Vielzahl von Methoden, beginnend von einer manuellen Blutzellzählung bis hin zu automatisierten Geräten steht uns dafür zur Verfügung. Dabei sollen Hämatologiesysteme eine Hilfestellung für den Anwender darstellen, die möglichst ohne größeren Aufwand in kürzester Zeit akkurate Ergebnisse liefern.

Neben Angaben von Zellzahlen und Hämoglobinkonzentrationen sind durch weitere Interpretation der Messergebnisse, zum Beispiel durch Betrachtung der Scattergramme, Beurteilungen über die Zellmorphologie und pathologische Zellpopulationen möglich.

Auf Grund von speziesspezifischen Unterschieden der Blutzellen gilt es, für jede Tierart Hämatologiesysteme mit einer Referenzmethode zu vergleichen. Besonders bei der Tierart Katze, die zu Thrombozytenaggregaten neigt, ist eine korrekte Beurteilung und Interpretation der Ergebnisse wichtig.

Im Mittelpunkt der Studie stehen der pochH-100iV Diff (Firma: Sysmex), ein impedanzbasiertes Gerät, das für die tierärztliche Praxis bestimmt ist, sowie der XT-2000iV (Firma: Sysmex), ein auf Laser und Fluoreszenz basiertes Gerät für Einsendelabore. Entsprechend ihrer Einsatzgebiete werden die jeweiligen Besonderheiten herausgearbeitet und anschließend diskutiert. Verglichen werden die beiden Hämatologiesysteme mit dem ADVIA 2120 (Firma: Siemens Medical Solutions) sowie mit einer manuellen Leukozytendifferenzierung, einer manuellen Retikulozytenzählung und dem Zentrifugenhämatokrit.

Ziel dieser Studie ist es, die beiden oben genannten Hämatologiesysteme der Firma Sysmex, die in der Humanmedizin bereits als Standard gelten, für die Tierart Katze zu evaluieren. Zusätzlich sollen tierartige Besonderheiten herausgearbeitet werden, um entsprechende Feineinstellungen der Geräte darauf aufbauen zu können.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Evaluation von Messgeräten

Die Evaluation von Hämatologiesystemen ist ein wichtiger Schritt, um die Leistung sowie die Vor- und die Nachteile dieser Geräte zu erfassen.

Das „International Council for Standardization in Hematology“ (ICSH) erstellt eine Richtlinie, in der die Vorgehensweise für Evaluationen einer Methode vorgegeben wird. Die Messgenauigkeit wird darin als Übereinstimmung des erwarteten Wertes und des „wahren“ Wertes gesehen (ICSH, 1994).

Der „wahre“ Wert muss mittels einer vorgegebenen Referenzmethode ermittelt werden:

- Hämoglobinemessung: ICSH Referenzmethode (ICSH 1987; NCCLS 1994)
- PCV: ICSH Referenzmethode (ICSH 1980a) oder Mikrohämatokrit-Methode (ICSH 1989)
- RBC: ICSH Referenzmethode (ICSH 1988)
- WBC: ICSH Referenzmethode (ICSH 1988)
- Differentialblutbild: NCCLS H20-A (1992)
- Thrombozytenzählung: ICSH empfohlene Methode (1988b)
- Retikulozytenzählung: ICSH empfohlene Methode (1992), Durchflussszytometrie H44-P (NCCLS 1993)

Es werden verschiedene Formen von Fehlern charakterisiert und in drei Kategorien eingeteilt: 1.) Präanalytische Fehler, wie zum Beispiel falsche Handhabung der Proben; 2.) Gesamtfehler (die Messung betreffend); 3.) Postanalytischer Fehler (Jensen und Kjølgaard-Hansen, 2006). Bei der Validierung einer Methode kommt es auf die Einschätzung des Gesamtfehlers an (Westgard, 2003). „Zufällige Fehler“ oder die „Impräzision“ werden mittels Standardabweichung einer Wiederholungsmessung quantifiziert.

Als „systematische“ Fehler werden konstante Fehler, die zu jeder Konzentration gleich bleiben, und proportionale Fehler, die sich abhängig von der Konzentration verändern, bezeichnet.

## 2. Literaturübersicht

Zusammenfassend beinhaltet der „Gesamtfehler“ sowohl die zufälligen als auch die systematischen Fehler (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2006; Westgard, 2003).

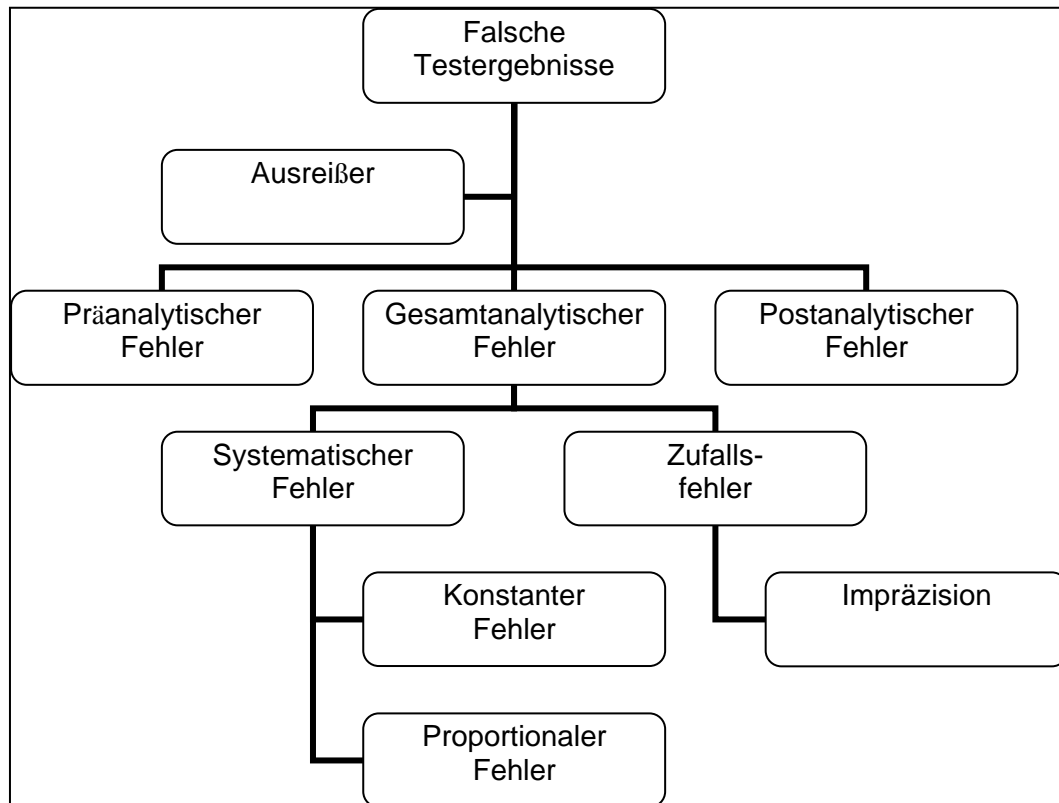


Abbildung 2.1 Verschiedene Fehlerkategorien (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2006)

## 2. Literaturübersicht

---

Das „National Committee for Clinical Laboratory Standard“ (NCCLS), das heute Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) heißt, sowie das ICSH, haben einige Evaluationsprotokolle erstellt, die das Sammeln der richtigen Daten und das Anwenden der entsprechenden Statistikmethoden erleichtern sollen (Westgard, 1995). Um eine Methode und ihre Fehler richtig einschätzen zu können bedarf es verschiedener Experimente, auf die in den folgenden Kapiteln weiter eingegangen wird.

### 2.1.1 Prüfung der Linearität

Die CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) empfehlen eine Prüfung der Linearität einer Methode, indem Serien von bekannten Konzentrationen oder bekannten Verdünnungen gemessen werden. Das NCCLS/CLSI (NCCLS Document EP6-P) fordert mindestens 4 oder besser 5 verschiedene Verdünnungsstufen.

Auf die y-Achse werden die gemessenen Daten, auf die x-Achse die erwarteten Daten aufgetragen. Der Linearitätsbereich einer Methode kann visuell, indem man eine Gerade durch die ermittelten Daten zieht oder anhand einer linearen Regressionsanalyse bestimmt werden (Westgard, 2003).

Die Indizes der Erythrozyten und der Thrombozyten (MCV, MCH, MCHC, RDW, MPV) sollten nicht von dem Verdünnungseffekt beeinflusst werden (ICSH, 1994).

### 2.1.2 Wiederholungsexperiment

Zufällige Fehler werden anhand von Wiederholungsmessungen erhoben. Dabei unterscheidet man Wiederholungen innerhalb einer Messung und Wiederholungen innerhalb eines Tages oder zwischen mehreren Tagen.

Aus den Wiederholungsmessungen werden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient ermittelt.

Die Standardabweichung (SD) beschreibt die erwartete Verteilung der Ergebnisse, der Variationskoeffizient wird angegeben als  $SD/Mittelwert \cdot 100\%$ . Idealerweise sollte die Verteilung eine Gaußsche Glockenkurve ergeben.

Als Minimum werden 20 Wiederholungen innerhalb einer Messung oder innerhalb eines Tages von je einer Probe mit hohen und niedrigen Werten gefordert.

## 2. Literaturübersicht

---

Die Durchführung der Wiederholungsmessungen über mehrere Tage hinweg empfiehlt sich mit hohen und niedrigen Werten an 20 aufeinander folgenden Tagen. Für Wiederholungen innerhalb einer Messung oder innerhalb eines Tages sollte die Standardabweichung ein Viertel oder weniger des erlaubten Gesamtfehlers (total error) betragen, bei Wiederholungsmessungen zwischen mehreren Tagen ist eine Abweichung zu einem Drittel oder weniger erlaubt (Westgard, 2003).

### 2.1.3 Antikoagulanz

Als Antikoagulanz sollte das Präparat gewählt werden, das vom Hersteller empfohlen wird. Empfohlen wird  $K_3$  EDTA, auch Citrat und Heparin sind möglich (ICSH, 1994; von Rücker et al., 1994).

EDTA bindet Kalzium und andere Kationen, die in der Gerinnungskaskade eine Rolle spielen. Dieser Gerinnungsinhibitor zeichnet sich durch eine gute Erhaltung der Zellmorphologie aus und verhindert bakterielles Wachstum. Bei ungenügender Füllung der Blutröhrchen verursacht EDTA auf Grund seiner hypertonen Eigenschaft eine Schrumpfung der Zellen, was zu einer Verminderung des Hämatokritwertes (PCV) und des mittleren Erythrozytenvolumens (MCV) sowie einem Anstieg der mittleren Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) führt (Meinkoth und Allison, 2007). In der Literatur wird für die Hämatologie meist EDTA als Antikoagulanz angegeben.

Heparin verstärkt die Wirkung von Antithrombin 3, welches wiederum Thrombin und andere Gerinnungsfaktoren inaktiviert. Ein Nachteil für die Hämatologie ist, dass es die Leukozytenmorphologie und deren Färbeeigenschaften verändert (Stockham und Scott, 2008).

Citrat bindet reversibel Kalzium und eignet sich somit für die Messung von verschiedenen Gerinnungsparametern. Da dieses Präparat im Vergleich zu anderen Antikoagulantien ein relativ großes Volumen benötigt, muss das Verhältnis 9:1 von Blut zu Citrat eingehalten werden (Meinkoth und Allison, 2007). Dem Verdünnungseffekt entsprechend muss der Anwender die Blutzellzählung und -differenzierung umrechnen.



## 2. Literaturübersicht

---

### 2.1.4 Alterung und Lagerung der Blutprobe

Um den Einfluss der Zeit und der Lagerungstemperatur auf die Blutprobe zu ermitteln, werden Messungen zum Zeitpunkt von 0, 30 Minuten, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden empfohlen. Die Proben sollten jeweils bei Raumtemperatur und Kühlschranktemperatur (4°C) aufbewahrt werden (ICSH, 1994).

### 2.1.5 Carry-over

Zur Ermittlung der Verschleppung (Carry-over) von Blutzellen, die dadurch die darauf folgende Blutprobe beeinflussen, werden Messungen von Proben mit hohen Werten gefolgt von Proben mit niedrigen Werten durchgeführt. Die Messung erfolgt jeweils drei Mal hintereinander (ICSH, 1994).

### 2.1.6 Methodenvergleich

Ein Vergleich einer neuen Methode sollte optimalerweise mit dem „Goldstandard“ erfolgen, jedoch ist es in der Labordiagnostik unmöglich, einen echten beziehungsweise wahren Wert zu ermitteln. Ferner muss der Vergleich anhand bereits etablierter Methoden erfolgen (Bland und Altman, 1999).

Mit dem Vergleich einer zu evaluierenden Methode mit einer Referenzmethode werden systematische Fehler (konstant oder proportional) festgestellt. Ein Minimum von 40 Proben ist dafür erforderlich, wobei sich die Konzentrationen der Proben gleichmäßig über den gesamten Messbereich verteilen sollten. Außerdem ist es von Vorteil, wenn der Bereich um den Entscheidungspunkt (Cut-Off) mehrfach repräsentiert ist. Einfachmessungen sind ausreichend, allerdings können durch Anfertigung von Zweifachmessungen, gemessen in unterschiedlicher Reihenfolge, Ausreißer und andere Fehlerquellen einfacher identifiziert werden (Lumsden, 2000). Die Proben sollten innerhalb von zwei Stunden mit den verschiedenen Methoden gemessen sein (Westgard, 2003).

Die im Methodenvergleich erhobenen Daten können anhand verschiedenster Verfahren statistisch analysiert werden (Lumsden, 2000).

## 2. Literaturübersicht

---

Mittels Korrelations- und Regressionsanalyse wird der Korrelationskoeffizient errechnet. Ist die Spannweite der analysierten Daten weit (Korrelationskoeffizient  $\geq 0,99$ ), so ist eine lineare Regression ausreichend. Der Y-Achsenabschnitt (Intercept) und die Steigung (Slope), sowie die  $S_{y/x}$  (Standardabweichung der Messergebnisse über der Regressionsgeraden) dienen zur Fehlerbeurteilung. Der Korrelationskoeffizient darf niemals zur alleinigen Entscheidung dienen, ob eine Methode akzeptiert wird oder nicht (Westgard, 2003).

Geht man von einem linearen Verhältnis zweier gemessener Parameter aus, drückt der Korrelationskoeffizient  $r$  (Pearson's product moment correlation coefficient) den Grad der linearen Assoziation aus. Der Wert 0 bedeutet, dass keine Assoziation zwischen zwei gemessenen Daten vorhanden ist. Bei einer positiven Korrelation (+1) kann man von einer idealen linearen Beziehung zweier Werte sprechen, bei einer negativen Korrelation steigt der eine Wert, während der andere fällt.

In einem nicht-parametrischen Verfahren, wozu die Berechnung des Spearman Korrelationskoeffizienten  $r_s$  (spearman's rank correlation coefficient) zählt, werden keine Annahmen über eine Verteilungsform der Daten gestellt, das heißt die Daten müssen nicht normalverteilt sein. Dabei werden ebenfalls Zahlenangaben zwischen -1 und +1 verwendet, wobei „0“ bedeutet, dass keine Rangkorrelation zwischen zwei Werten vorhanden ist (Petrie und Watson, 2006).

Der Y-Achsenabschnitt erlaubt die Beurteilung des konstanten Fehlers, die Steigung die des proportionalen Fehlers.  $S_{y/x}$  ist ein Maß für den zufälligen Fehler.

Ist die Spannweite der Daten und gleichzeitig der Korrelationskoeffizient zu gering (Korrelationskoeffizient  $< 0,975$ ), ist eine lineare Regression nicht geeignet (Westgard, 2003; Jensen und Kjølgaard-Hansen, 2006). In diesem Fall sollten komplexere Analysen, wie im Folgenden beschrieben, angewendet werden:

Die lineare Regression legt lediglich Wert auf zufällige Fehler der zu evaluierenden Methode, wohingegen eine Deming Regression diese auch in der Referenzmethode berücksichtigt. Für eine Deming Regression werden Angaben zur Präzision beider Methoden benötigt (Cornbleet und Gochman, 1979).

Die Passing-Bablok Regression berücksichtigt ebenfalls eine Impräzision beider Methoden. Die Daten müssen jedoch nicht normalverteilt sein (Passing und Bablok, 1983).

## 2. Literaturübersicht

---

Bland und Altman beschreiben eine Analyse, bei der der Mittelwertunterschied (bias) auf die y-Achse, der Mittelwert beider Methoden auf die X-Achse aufgetragen wird. Anhand des „bias“ kann der systematische Fehler erkannt werden. Ist der „bias“ nicht nahe Null, so ergeben die zu vergleichenden Methoden unterschiedliche Resultate. Anhand der 95 prozentigen Übereinstimmungsgrenze wird der zufällige Fehler dargestellt (Bland und Altman, 1999). Bei einer Bland Altman Analyse wird davon ausgegangen, dass es keinen „wahren“ Wert gibt, der als Referenz verwendet werden kann.

Im gepaarten t-Test werden der Mittelwertunterschied (bias), die Standardabweichung der Unterschiede und der t-Wert errechnet. Der t-Wert stellt das Verhältnis zwischen dem systematischen Fehler und dem zufälligen Fehler dar. Der t-Wert trifft lediglich eine Aussage darüber, ob ein systematischer Fehler existiert oder nicht. Er darf nicht als einzige Aussage über die Akzeptabilität einer Methode verwendet werden (Westgard, 2003).

Das Ziel eines Methodenvergleiches oder einer Evaluation von Messgeräten ist die Beurteilung, ob ein solches Gerät nun für erwartete Standards geeignet ist und wie die Fehler, die in einem Resultat auftauchen, einzuschätzen sind. In der Humanmedizin sind in den Kriterien der CLIA für etwa 80 Laborparameter die maximal erlaubten Werte des Gesamtfehlers („total error“) einer Methode definiert (Westgard, 1995). Eine Festlegung dieser Art ist für die Veterinärmedizin nicht vorhanden. Allerdings existieren in der Literatur Vorschläge für den maximal erlaubten Gesamtfehler, die sich von den Zahlenwerten der CLIA unterscheiden (Freeman und Gruenwaldt, 1999). Als Alternative können zur Beurteilung intercept, slope (aus linearer, Deming Regression oder Passing Bablok Regression) und bias (aus Bland-Altman Analyse) hinzugezogen werden (Becker, 2007; Koch und Peters, 2001; Westgard, 2003).

### 2.2 Blutzellanalyse

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Blutzellen stehen dem Anwender heutzutage sowohl preisgünstige manuelle Zählmethoden als auch automatische Messgeräte zur Verfügung.

Eine aufwendige und auch fehleranfällige Methode stellt das Zählkammerverfahren dar. Die am weitesten verbreiteten Zählkammern sind die Neubauer-Zählkammern. Damit ist eine Quantifizierung der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten möglich (Kraft und Dürr, 1999).

Eine manuelle Differenzierung von panoptisch gefärbten Blutausstrichen erlaubt neben der Quantifizierung der verschiedenen Leukozyten auch eine morphologische Beurteilung der Zellen. Durchführung und Interpretation hängen jedoch stark von der Erfahrung der Person ab (Koepke et al., 1992; Vives Corrons et al., 2006).

Die Anzahl der ausgewerteten Zellen beeinflusst die Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Zellzählung. Bei einer Auswertung von 400 statt 100 Zellen verdoppelt, bei einer Auswertung von 10000 Zellen verzehnfacht sich die Präzision (Rümke et al., 1975).

Das "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) fordert eine Referenzmethode zur Erstellung eines Differentialblutbildes (Koepke et al., 1992). Dabei gilt eine manuelle Differenzierung von 2 x 200 Leukozyten durch zwei verschiedene Untersucher als Methode der Wahl.

### 2.3 Automatische Messung von Blutproben

Eine automatisierte Analyse von Blutproben bedeutet eine deutliche Zeitersparnis für den Anwender. „Unproblematische“ Ergebnisse können innerhalb von kurzer Zeit erfasst werden, wohingegen man sich mehr auf die pathologischen Blutproben durch nachgezogene manuelle Validierung des Blutausstriches konzentrieren kann.

In den folgenden Kapiteln wird auf die verschiedenen Messprinzipien der automatischen Blutzellanalyse eingegangen. Im Anschluss erfolgt eine Beschreibung der in dieser Dissertation verwendeten Geräte.

#### 2.3.1 Widerstandsmessung

Mitte des 20. Jahrhunderts wurde der „Coulter-Counter“ von Wallace H. Coulter erfunden und 1953 zum ersten Mal als Patent angemeldet (Houwen, 2003). Noch heute basieren eine Vielzahl von Hämatologiesystemen auf dem Prinzip der Widerstands- oder Impedanzmessung (Dewhurst et al., 2003; Kieffer et al., 2007).

Eine Elektrolytlösung befindet sich in zwei Flüssigkeitsräumen, die durch eine kleine Messöffnung verbunden sind. Durch zwei Elektroden, die sich in den jeweiligen Flüssigkeitsräumen befinden, wird ein Gleichstrom geleitet.

Blutzellen, die durch die Messöffnung gesaugt werden, stellen schlechte elektronische Leiter dar. Das Prinzip der Widerstandmessung besteht aus der Veränderung der elektrischen Stromstärke durch unterschiedlich große Partikel. Die Stromstärke verändert sich proportional zum Partikelvolumen. Durch die Vorgabe von Diskriminatoren und Schwellenwerten können das Zellvolumen und absolute Zellzahlen ermittelt werden. In der Veterinärmedizin ist jedoch zu beachten, dass für jede Tierart eine Etablierung von eigenen Diskriminatoren und Schwellenwerten notwendig ist (Moritz, 2000).

Das Hämatologiesystem pochH-100iV Diff basiert auf der Impedanzmethode und wird in einem der folgenden Kapitel näher beschrieben.

### 2.3.2 Quantitative Buffy-Coat-Analyse

Diese Methode basiert auf der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen. Die Blutprobe wird in eine Hämatokritkapillare gefüllt, die einen frei darin beweglichen, zylindrischen Kunststoffschwimmer enthält. Die Kapillare enthält Akridin Orange, welches Zellbestandteile (DNA, RNA, Lipoproteine, Glycosamine) anfärbt und fluoresziert (Moritz, 2000).

Nach Zentrifugation trennen sich die Zellbestandteile je nach Dichtigkeit auf, und der Buffy-Coat wird durch den Schwimmer ausgedehnt. Durch die Fluoreszenzintensität und Schichtdicke der jeweiligen Zellpopulationen ermittelt das Hämatologiesystem die Parameter WBC, HCT, MCHC, HGB, PLT, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (Levine et al., 1986). Das Gerät stellt Buffycoat-Profilkurven dar, die der untersuchenden Person als Kontrolle dienen, ob die Grenzen zwischen den unterschiedlichen Zellschichten richtig gesetzt worden sind (Wegemann, 1998).

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (optoelektrisches Messprinzip, Streulichtmethode) arbeitet mit Licht (heutzutage meist Laserlicht), welches von den zu messenden Partikeln gestreut wird. Das Streulicht wird mit Hilfe von Photodetektoren (Photomultiplier) in elektrische Signale umgewandelt. Die Photodetektoren sind in definierten Winkelbereichen angegeben und liefern somit unterschiedliche Informationen. Die Vorwärtslichtstreuung (Kleinwinkelstreulicht) ist ein relatives Maß für die Zellgröße. Das Großwinkelstreulicht gibt die intrazelluläre Beschaffenheit wieder (Moritz, 2000). Die Hämatologiesysteme XT-2000iV (Fa. Sysmex) und ADVIA 2120 (Fa. Siemens Healthcare Diagnostics), letzteres wird als Referenzmethode in dieser Studie verwendet, basieren auf dieser Methode. Die Besonderheiten des XT-2000iV sind im Kapitel 2.5 dargestellt.

### 2.4 Sysmex pocH-100iV Diff



Abbildung 2.2 pocH-100iV Diff (Photo: Sysmex)

Das Hämatologiesystem pocH-100iV Diff (Fa Sysmex) beruht auf der Impedanzmethode. Die Blutprobe (15  $\mu$ l) wird aspiriert, verdünnt und in die Transducer-Kammer überführt. Diese Kammer ist unterteilt und durch eine winzige Öffnung verbunden („Aperture“). An beiden Seiten dieser Öffnung befinden sich Elektroden, zwischen denen ein Strom fließt, wobei die einzelnen Blutzellen, die durch die Öffnung gelangen, einen Widerstand im Stromkreis darstellen. Jede einzelne Zelle generiert einen elektrischen Impuls, so dass die absolute Zellzahl anhand der gezählten Impulse bestimmt wird. Die unterschiedliche Impulshöhe ist Maß für das Zellvolumen. Letztendlich erfolgt dann die Darstellung der Impulse in Form eines Histogramms.

Die Zählung der Erythrozyten und Thrombozyten findet in einem gemeinsamen Meßvorgang und in derselben Messkammer statt, in der zuvor die Hämoglobinmessung und Leukozytenzählung erfolgt sind. Um einerseits Hämoglobin freizusetzen, andererseits ein Interferieren der verschiedenen Zellarten zu vermeiden, werden für die Analyse der Leukozyten die Erythrozyten lysiert. Die im Vergleich zur Gesamterythrozytenzahl wesentlich geringere Anzahl der Leukozyten hingegen beeinflusst im Falle der Erythrozytenzählung das Zählergebnis nicht. Eine Ausnahme stellt das Vorliegen hochgradiger Leukozytosen ( $> 100.000/\mu$ l) dar, hier kann der Erythrozytenzählwert im Nachkommastellenbereich erhöht sein (Sysmex, 2006; Sysmex, 2008).

## 2. Literaturübersicht

Um eine fehlerhafte Quantifizierung durch Überlagerungen oder Rezirkulation von Zellen zu vermeiden, findet bei der Messung von Erythrozyten und Thrombozyten die hydrodynamische Fokussierung Anwendung. Ein Mantelstrom (Reagenz: pocH-pack D) umgibt die Blutprobe, so dass die Blutzellen hintereinander durch die Öffnung geschleust werden können.

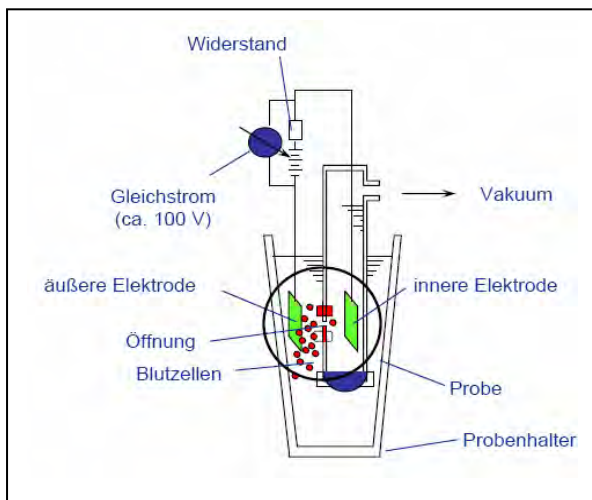


Abb. 2.3 a

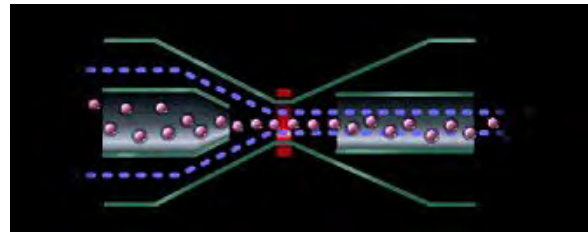


Abb. 2.3 b

Abbildung 2.3 Prinzip der Widerstandsmessung (Abb. 2.3 a) und der hydrodynamischen Fokussierung (Abb. 2.3 b) (Sysmex, Schulungsunterlagen)

### 2.4.1 Hämoglobinmessung

Die Cyanmethämoglobinmethode wurde 1966 als Standardmethode empfohlen (ICSH, 1966, DIN 58931). Kaliumhexocyanoferrat oxidiert das an Hämoglobin gebundene  $\text{Fe}^{2+}$  zu Methämoglobin. Dieses reagiert mit Kaliumcyanid und bildet den stabilen Cyanhämoglobinkomplex, welches eine maximale Absorption bei 546 nm aufweist. Das Absorptionsmaß bei dieser Wellenlänge ist proportional zum Hämoglobingehalt im Blut. Auf Grund der Toxizität des Cyanid und der langen Messdauer gilt diese Methode heutzutage nicht mehr als Methode der Wahl. Als



## 2. Literaturübersicht

---

weiterer Nachteil zählt die lange Inkubationszeit und damit verbundene Dauer der Messung.

Die cyanfreie Hämoglobinmessung stellt eine umweltfreundlichere und schnellere Messmethode dar. Das Reagenz „poch-pack LVD“ wird für die Hämoglobin- und Leukozytenmessung verwendet. Dieses Reagenz enthält quartäre Ammoniumsalze, die zu einer Lyse der Erythrozytenmembran führen. Das somit frei gewordene Hämoglobin oxidiert zu Methämoglobin. Die Konzentration dieses Moleküles ist proportional zur Hämoglobinkonzentration und kann bei seinem Absorptionsmaximum von 555 nm photometrisch erfasst werden (Sysmex, 2006; Sysmex, 2008).

### 2.4.2 Hämatokritbestimmung

Die Berechnung des Hämatokritwertes erfolgt anhand des Erythrozytenvolumens mittels der kumulativen Impulshöhensummierung. Hierfür kommt folgende Formel zur Anwendung:

$$\text{HCT (\%)} = (1/V_t k) \sum \text{Ph} * 100$$
$$\text{Ph} = k * V_{\text{ery}}$$

$V_t$  = Gesamtvolumen

$k$  = Konstante

$\text{Ph}$  = Impulshöhe

$V_{\text{ery}}$  = Größe eines Erythrozyten  
(Sysmex, 2008)

## 2. Literaturübersicht

### 2.4.3 Histogramm

Die Messergebnisse präsentiert das Gerät als Report in Form von numerischen und graphischen Daten (Histogramme).

Dabei wird auf die x-Achse des Histogramms die Zellgröße und auf die y-Achse die relative Häufigkeit des Auftretens von Zellen einer bestimmten Größe aufgetragen.

Variable Diskriminatoren (Treshholds) unterscheiden die einzelnen Zellpopulationen voneinander.

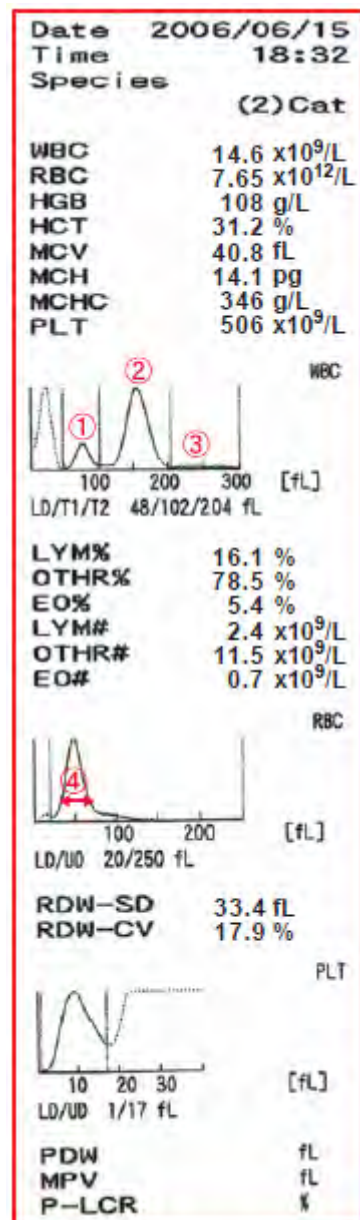


Abbildung 2.4 Ausdruck eines Messergebnisses des pochH-100iV Diff, 1= Lymphozyten, 2= Others, 3= Eosinophile, 4= Red cell distribution width

## 2. Literaturübersicht

---

Die gemessenen Daten und die Histogramme liefern die Ergebnisse folgender Parameter: WBC, RBC, HGB, HCT, LYM, OTHR, EO, PLT, PDW, MPV, P-LCR, RDW-SD, RDW-CV.

Die Parameter PDW, MPV und P-LCR werden bei der Tierart „Katze“ nicht angegeben.

Anhand von RBC, HGB und HCT werden die Parameter MCV, MCH und MCHC errechnet.

$$\text{MCV (fL)} = \text{HCT (\%)} / \text{RBC} (*10^{12}/\text{L}) * 100$$

$$\text{MCH (fmol)} = \text{HGB (mmol/l)} / \text{RBC} (*10^{12}/\text{L}) * 10$$

$$\text{MCHC (mmol/l)} = \text{HGB (mmol/l)} / \text{HCT (\%)} * 100$$

(Kraft und Dürr, 1999; Sysmex, 2006)

### 2.5 Sysmex XT-2000iV



*Abbildung 2.5 XT-2000iV (Photo: Sysmex)*

Der XT-2000iV ist wie der ADVIA 2120 auf Grund der hohen technischen Fähigkeiten sowie der sehr guten Performance besonders für Großlabore und größere Kliniken geeignet.

Die Messtechnik kombiniert die Impedanztechnologie und Fluoreszenz-Durchflusszytometrie.

#### 2.5.1 Messprinzip der Erythrozyten und Thrombozyten

Zur Erfassung der Erythrozyten- und Thrombozytenzahl dient die Impedanzmethode (wie oben beschrieben). Mittels hydrodynamischer Fokussierung gelangen die Zellen hintereinander durch die Messöffnung. Dabei bildet das Reagenz „Cellpack“ den Mantelstrom und dient einer Verdünnung der Blutprobe. Dies hat eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit zur Folge.

Die Ergebnisse sind wie beim poCH-100iV Diff numerisch sowie als graphische Datenreporte in Form von Scattergrammen (Punktwolkendiagramme) und Histogrammen dargestellt. Die einzelnen Zellpopulationen werden durch das sogenannte „Adaptive Cluster Analysis System“ (ACAS), einem flexiblen System der Zuordnung einzelner Messsignale zu Cluster-spezifischen Zentroiden, voneinander unterschieden (Sysmex, 2005).

## 2. Literaturübersicht

---

Der Hämatokritwert wird aus der Summe der Einzelimpulse (kumulative Impulshöhensummierung) der Erythrozyten bestimmt (siehe Hämatokritbestimmung pocH-100iV Diff).

Das mittlere Zellvolumen (MCV), der mittlere Hämoglobingehalt der Erythrozyten (MCH) sowie die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) sind anhand der gemessenen Parameter RBC, HGB, HCT errechnete Werte.

Die Berechnung der Erythrozytenverteilungsbreite „red cell distribution width“ (RDW) erfolgt über zwei verschiedene Rechenwege:

Betrachtet man das Histogramm der Erythrozytenpopulation, wird der höchste Punkt der Kurve als 100% betrachtet. Bei 20% der Gesamthöhe befindet sich die RDW-SD (red cell distribution width- standard deviation).

Die Berechnung des RDW-CV (red cell distribution width- coefficient of variation) erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{RDW-CV (\%)} = (L2-L1)/(L2+L1) * 100$$

L1 und L2 grenzen 68,26% der Gesamtfläche unter der Erythrozytenkurve ein.

Die Thrombozytenpopulation wird durch jeweils einen oberen und unteren variablen Diskriminator eingegrenzt, wobei ein weiterer Diskriminator bei 12 fl fix ist. Die Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) sowie das MPV (mean platelet volume) sind errechnete Werte.

Als P-LCR (platelet large cell ratio) bezeichnet man die Fläche unter der Thrombozytenkurve, die sich zwischen dem oberen und dem fixen Diskriminator befindet (Sysmex, 2005).

### 2.5.2 Hämoglobinmessung

Die Hämoglobinbestimmung erfolgt Zyanid-frei, beginnend mit dem Reagenz „Sulfolyser“ Sodiumlaurylsulfat (SLS), das sich mit seinem hydrophilen Teil an das Globin bindet und dessen Konformitätsänderung auslöst. Anschließend findet eine Oxidationsreaktion von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  statt. Die hydrophilen Gruppen des SLS binden nun an  $\text{Fe}^{3+}$  und lassen ein stabiles Reaktionsprodukt entstehen, das photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 555nm bestimmt werden kann (Sysmex, 2005).

### 2.5.3 DIFF-Kanal

Die Leukozytenzählung und -differenzierung erfolgt mit einer Fluoreszenz-Durchflusszytometrie.

Die Verdünnung der Blutprobe sowie eine Lyse der Erythrozyten findet mit dem Reagenz Stromatolyser-4DL statt. Nach Lyse der Erythrozyten werden die Leukozyten durch hydrodynamische Fokussierung hintereinander in die Durchflusszelle gebracht. Ein Halbleiterlaser sendet sein Licht mit einer Wellenlänge von 633 nm auf die Zellen, die die Durchflusszelle passieren. Dabei streut das Licht in verschiedene Richtungen und je eine Photodiode erfasst das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht. Mit dem Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht) wird die Zellgröße, mit dem Sidescatter (Seitwärtsstreulicht) die Granularität der Zelle analysiert (Abb. 2.5).

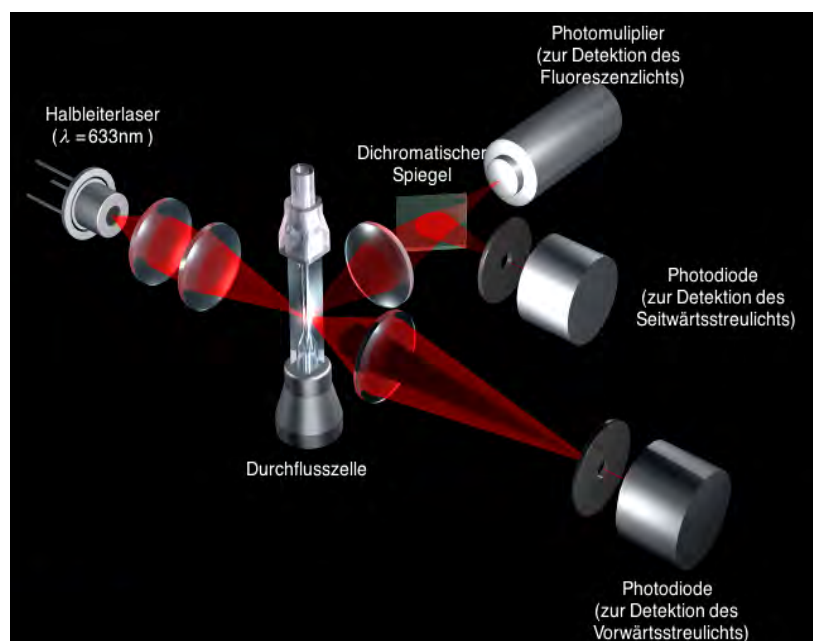


Abb. 2.5: Durchflusszelle und optisches System (Sysmex Schulungsunterlagen)

Zusätzlich kommt in der gleichen Messung eine Polymethinfärbung (Stromatolyser-4DS) zum Einsatz. Hierbei dringt fluoreszierender Farbstoff ins Zellinnere und bindet an DNA und RNA. Diese Supravitalfärbung verhindert eine Zerstörung der Zellen. Die von einem Photomultiplier erfasste Fluoreszenzintensität liefert Informationen über die Zellaktivität (DNA) sowie über die Zytoplasmaaktivität (RNA, Proteinsynthese) (Abb. 2.6).

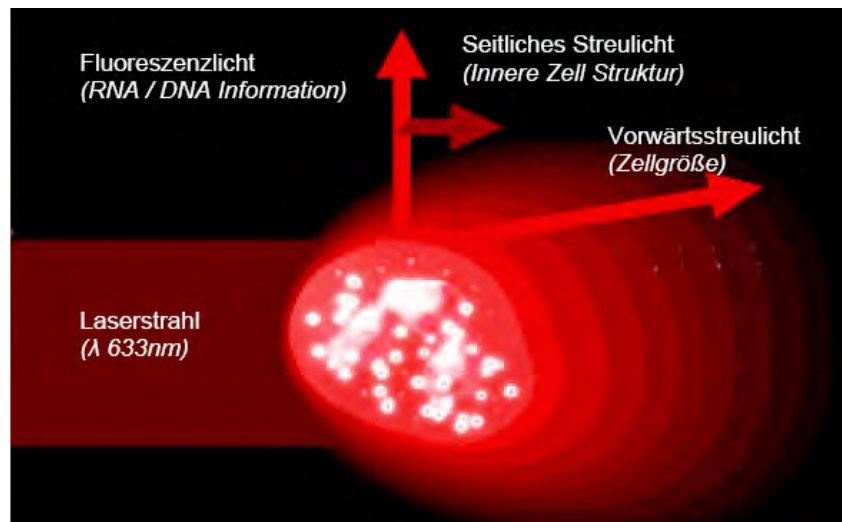


Abb. 2.6: Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Sysmex, Schulungsunterlagen)

Der graphische Ergebnisreport erfolgt im DIFF-Scattergramm (Abb. 2.7). Auf der X-Achse ist die Intensität des Sidescatters (SSC), auf der Y-Achse die Seitwärtsfluoreszenz (SFL) dargestellt. Auf Grund der verschiedenen Eigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen findet eine Differenzierung statt (Sysmex, 2005).

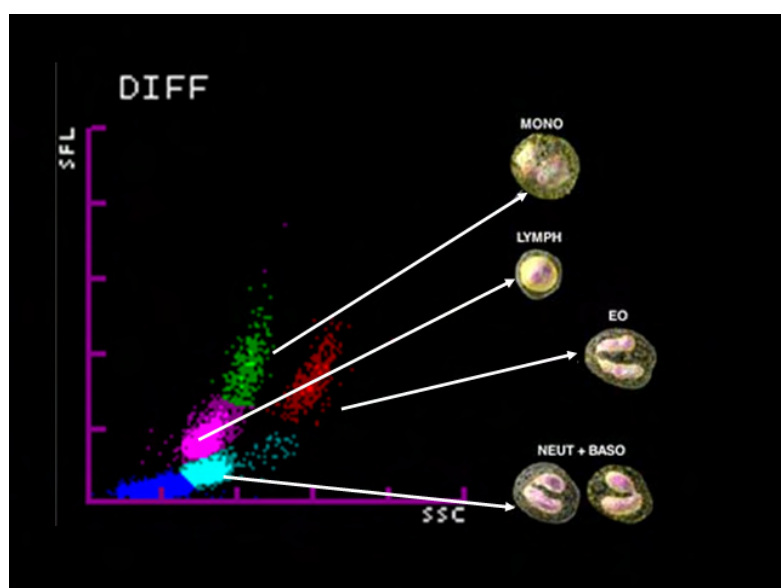


Abb.2.7: Scattergramm des DIFF-Kanals (Britisch Kurzhaarkatze, Labornummer 9002403602 und Sysmex, Schulungsunterlagen)

### 2.5.4 WBC/BASO-Kanal

Nach der Verdünnung der Blutprobe mit dem Stromatolyser-FB und der Lyse der Erythrozyten werden mit Ausnahme der basophilen Granulozyten die Zellen bis auf den Kern geschrumpft und ihre Zelleigenschaften mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Die Trennung der Populationen erfolgt mittels Vorwärtstreulicht (Volumen der Zelle) und Seitwärtstreulicht (Granularität und innere Struktur), wobei sich die basophilen Granulozyten separat von den anderen Leukozyten darstellen (Abb. 2.8).

Die Doppelbestimmung der Gesamtleukozytenzahl durch den DIFF- und den WBC/BASO-Kanal dient der internen Qualitätskontrolle (Sysmex, 2005).

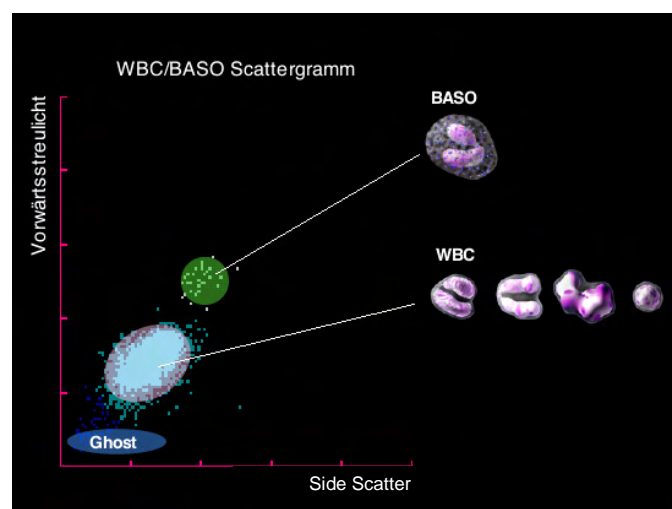


Abb.2.8: Scattergramm des WBC/BASO-Kanals (Sysmex, Schulungsunterlagen)

„Ghost“ = Zelldetritus, mittlere Wolke (WBC) = Leukozyten außer basophile Granulozyten, obere Wolke = basophile Granulozyten

### 2.5.5 Retikulozyten- und Thrombozytenanalyse

Im Retikulozytenkanal (RET-Kanal) erfolgt die Bestimmung der Retikulozyten, der reifen Erythrozyten und der Thrombozyten. Das Reagenz „RET SEARCH(II) Diluent“ perforiert die Zellmembran und „RET SEARCH(II) Dye“ färbt die DNA-/ RNA-haltigen Strukturen der Zellen an. Mittels Halbleiterlaser und Fluoreszenz-



## 2. Literaturübersicht

---

Durchflusszytometrie werden die Zellgröße im Vorwärtsstreulicht und die Fluoreszenzintensität anhand der Seitwärtsfluoreszenz gemessen.

Das Scattergramm unterteilt die verschiedenen Reifungsstadien der Retikulozyten wie folgt: je stärker die Fluoreszenzanfärbung, desto unreifer der Retikulozyt. Dabei stellt die X- Achse die Fluoreszenzintensität und die Y- Achse die Zellgröße dar.

Zusätzlich macht sich die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie eine Erkennung der Thrombozyten anhand ihres Volumens und anhand ihres DNA-/RNA-Gehaltes zu Nutze. Dieses Messprinzip ist weniger anfällig gegen Störfaktoren der Thrombozytenzählung (zum Beispiel Agglutinate oder Riesenthrombozyten) als die Impedanzmethode.

Bei Auftreten eines abnormalen PLT Histogrammes der Impedanzmessung kann auf die Messergebnisse der Thrombozytenzählung im RET- Kanal zurückgegriffen werden. In diesem Fall wird eine Verwendung des optischen Thrombozytenwertes (PLT-O) im Ergebnisreport mit dem Symbol „&“ gekennzeichnet. Darüber hinaus kann bei neueren Software-Versionen in den Geräteeinstellungen für jede Tierart festgelegt werden, ob der impedanzbasierte oder der fluoreszenzoptische Thrombozytenwert als Standard reportiert werden soll.

Das Hämatologiesystem besitzt zudem die Besonderheit, retikulierte, RNS-reiche und somit unreife Thrombozyten erfassen zu können, was eine Aussage über die aktive Thrombopoese erlaubt (Pankraz et al., 2009). Die alternative Messung von retikulierten Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie, CD61-Antikörper als Thrombozytenmarker und Thiazolorangefärbung bedarf eines weitaus größeren Zeitaufwands.

In der Humanmedizin wurde das Hämatologiesystem Sysmex XE-2100 bereits zur Analyse der „Immature platelet fraction“ (IPF) evaluiert (Abb. 2.9) (Briggs et al., 2006; Hinzmann, 2007). In klinischen Studien konnte man belegen, dass das Gerät eine gute Reproduzierbarkeit der Messung unreifer Thrombozyten im Vergleich zur Durchflusszytometrie aufweist. Durch die Bestimmung der IPF in einer routinemäßigen, hämatologischen Untersuchung kann auf verschiedene Differentialdiagnosen einer Thrombozytopenie eingegangen werden. Bei einer Thrombozytopenie auf Grund einer Myelosuppression (Chemotherapie, Bestrahlung) erwartet man keine unreifen Thrombozyten, wohingegen bei einem peripheren

## 2. Literaturübersicht

Thrombozytenverlust (Blutung, thrombotische Mikroangiopathien, autoimmunthrombozytopenische Purpura) die IPF ansteigt (Hinzmann, 2007).

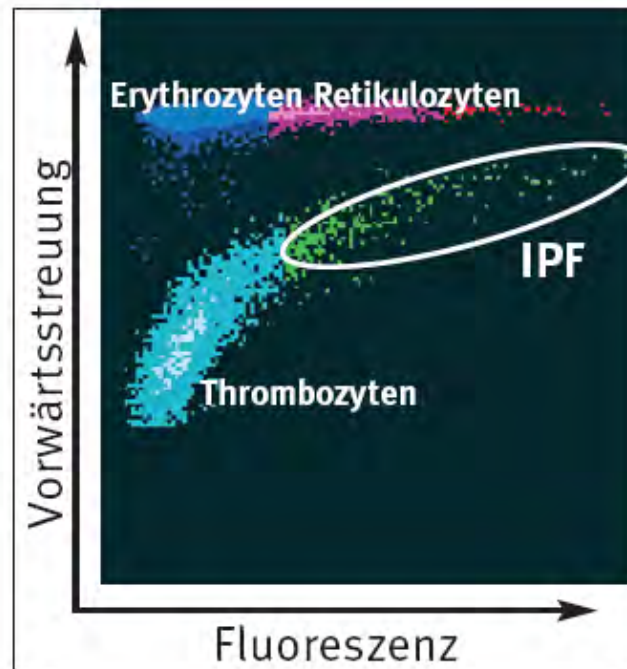


Abb. 2.9: IPF- Scattergramm (Quelle: Sysmex Xtra 1/2007)

### 2.6 Siemens ADVIA 2120



*Abb. 2.10: ADVIA 2120, Siemens Healthcare Diagnostics (Photo: Siemens)*

Dieses Hämatologiesystem steht mit unterschiedlichen Softwareversionen auch der Veterinärmedizin zur Verfügung. Das Gerät wendet die in Kapitel 2.3.3 beschriebene Durchflusszytometrie zur Messung der Zellzahlen an. Durch isovolumetrische Aufkuglung der Erythrozyten erzeugt jede gleichgroße Zelle das gleiche Streulichtsignal. Auch bei diesem Gerät stellt die hydrodynamische Fokussierung sicher, dass die Zellen einzeln in den Messkanal fließen.

Ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 670 nm trifft auf die zu messende Zelle und wird in verschiedene Winkelbereiche gestreut.

Die Analyse der Erythrozyten und Thrombozyten findet simultan in einem Messkanal statt. Dabei liefert das Gerät für beide Zellarten ein Niedrigwinkelsignal (Zellgröße) und ein Hochwinkelsignal (Dichte).

Die Gesamtleukozytenzahl erfolgt in zwei unabhängigen Messkanälen:

Im Peroxidasekanal geschieht die Leukozytenanalyse (WBCP) im Halogenlicht und mittels Peroxidasefärbung. Neutrophile Granulozyten und Monozyten färben sich mit Peroxidase an, lymphatische Zellen, basophile Granulozyten und die eosinophilen Granulozyten bei der Katze sind peroxidasenegativ.

In diesem Kanal findet eine Differenzierung der Leukozyten statt. Die Zählung der peroxidasenegativen eosinophilen Granulozyten der Katze findet im Retikulozytenkanal statt (Meyer, 2005).

## 2. Literaturübersicht

---

Als interne Qualitätskontrolle dient eine zweite Messung der Leukozyten im Basophilen-Kernsegmentierungskanal (WBCB). Darin werden alle Leukozyten, mit Ausnahme der basophilen Granulozyten, einem zytoplasmatischen Stripping unterzogen. Die Zellen sind nun anhand ihrer Größe und ihrer Chromatindichte mittels Laserstreulicht unterscheidbar (basophile Granulozyten, mononukleäre Leukozyten, polymorphnukleäre Leukozyten).

Die Retikulozytenmessung erfolgt mittels Färbung mit Oxazin 750. Im Laserlicht können die Zellgröße, der Hämoglobingehalt und der RNA-Gehalt erfasst und dadurch die Retikulozyten in unterschiedliche Reifungsgrade eingeteilt werden (Moritz, 2000).

Im Gegensatz zum ADVIA 120 arbeitet der ADVIA 2120 mit einer zyanidfreien Hämoglobinmessmethode (Bauer und Moritz, 2008).

### 2.7 Besonderheiten bei der Blutzellanalyse der Katze

#### 2.7.1 Thrombozyten

Eine starke Neigung zur Aggregatbildung der Katzenthrombozyten stellt für die automatische Blutzellzählung ein Problem dar. Thrombozyten-Clumps, die in der manuellen Zellzählung in der Ausstrichfahne identifizierbar sind, werden bei automatischen Hämatologiesystemen oft nicht erkannt beziehungsweise als andere Zellen (zum Beispiel Leukozyten) falsch interpretiert. Als Folge entstehen falsche Thrombozytopenien (Pseudothrombozytopenien) und auch falsche Leukozytenzahlen.

Katzenthrombozyten sind zwei- bis dreimal so groß wie die des Hundes und des Menschen und überlappen mit der Größe der Erythrozyten (Moritz und Hoffmann, 1997; Zelmanovic und Hetherington, 1998).

Die Neigung zur Bildung von Aggregaten wird vor allem in den niedrigeren Schwellenkonzentrationen der Aggregationsinduktoren zur Aggregationsauslösung gesehen. Kollagen, ADP und Thrombin sind in deutlich geringeren Konzentrationen stimulierbar als die des Hundes (Hart und Nolte, 1991).

Die Technik der Blutentnahme kann die Thrombozytenaggregation beeinflussen (Moritz und Hoffmann, 1997). Durch Verwerfen der ersten 2 bis 5 ml Blut konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Thrombozytenaggregate deutlich reduziert wurden.

Der Blutentnahmeort (V. cephalica antebrachii oder V. jugularis) scheint keine Rolle bezüglich des Auftretens von Agglutinen zu spielen (Moritz und Hoffmann, 1997).

Eine wesentliche Rolle in der Aggregatbildung der Thrombozyten spielt das Antikoagulum. Ein auf Citrat basierendes Antikoagulum, das Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol enthält, erwies sich signifikant niedriger aggregatbildend und somit signifikant niedriger pseudothrombozytopen und pseudoleukozytosen (Macey et al., 2002; Norman et al., 2001).

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass EDTA und Heparin als Antikoagulantien Thrombozytenagglutinate auslösen, Citrat jedoch die Verklumpung minimiert. (Lombarts und de Kieviet, 1988). In einer Studie mit Katzen konnte im Antikoagulumvergleich ermittelt werden, dass Citratblut deutlich seltener zu Thrombozytenagglutinen führt (Moritz und Hoffmann, 1997). Bereits eine

## 2. Literaturübersicht

---

Aufbewahrungszeit von 30 Minuten führte zu einer Zunahme der Agglutinate. Dies wurde vor allem bei Li-Heparin und K-EDTA-Proben beobachtet.

Insbesondere bei der Impedanzmethode, die die einzelnen Zellpopulationen anhand der Größe unterscheidet, stellen die Thrombozytenagglutinate ein Problem dar. Außerdem führt die Überlappung der Größe der Erythrozyten und Thrombozyten der Katze dazu, dass nur bei etwa der Hälfte der Blutproben eine näherungsweise Bestimmung der Thrombozytenzahl möglich ist (Mischke et al., 1995). Jedoch kann auch bei neueren Messmethoden eine falsch niedrige Thrombozytenmessung nicht ausgeschlossen werden. Wichtig ist dabei die Beurteilung der graphischen Darstellung der Messergebnisse. Im ADVIA 2120/120 werden beispielsweise Thrombozyten in einer zweidimensionalen Thrombozytenanalyse beurteilt. Interferierende Teilchen können somit auf Grund des unterschiedlichen Brechungsindex von Thrombozyten unterschieden werden. Außerdem werden die Thrombozytenaggregate im Peroxidasekanal erfasst (Meyer, 2005).

### 2.7.2 Retikulozyten

Retikulozyten stellen unreife Erythrozyten mit der für sie charakteristischen Substantia granulofilamentosa, bestehend aus präzipitierter Ribonukleinsäure, Mitochondrien und anderen Zellorganellen, dar. Diese kann mit einer Supravitalfärbung (zum Beispiel Brillantkresylblau oder Neumethylenblau) angefärbt werden. Man unterscheidet eine aggregierte und eine punktierte Form von Retikulozyten, wobei bei der Katze die Besonderheit vorliegt, dass beide Formen im Blut vorkommen. Aggregierte Retikulozyten reifen zu punktierten innerhalb von 12 Stunden, diese wiederum reifen in etwa 10 Tagen zu Erythrozyten heran. Nach einer Stimulation des Knochenmarks, zum Beispiel in Folge eines Blutverlustes, ist somit mit einem Anstieg von aggregierten Retikulozyten zu rechnen, somit sind diese aussagekräftig für eine Regeneration. Punktierte Formen steigen hingegen zwei bis vier Wochen später an (Fernandez und Grindem, 2006). Eine Unterscheidung zwischen aggregierten und punktierten Retikulozyten ist schwierig und erfolgt meist subjektiv. Je nach Literaturquelle werden mehr als 13 oder mehr als 15 Punkte in

einem Retikulozyten als aggregierte Form bezeichnet (Tvedten und Moritz, mündliche Mitteilung).

### **2.8 Ziel der Studie**

Das Ziel dieser Studie ist es, eine Evaluation der in ähnlicher Form in der Humanmedizin etablierten Hämatologiesysteme Sysmex pocH-100iV Diff und Sysmex XT-2000iV für die Tierart Katze durchzuführen. Dies dient in erster Linie zur Einschätzung der speziesspezifischen Software für den täglichen Routinegebrauch in Großraumlaboren aber auch in der tierärztlichen Praxis. Zusätzlich sollen die Besonderheiten der einzelnen Geräte und ihre Bedienerfreundlichkeit erfasst aber auch Daten über Lagerungsdauer und -temperatur sowie Messungen verschiedener Antikoagulanzen gesammelt werden.

Als weiteres Ziel ist die Interpretation der optischen Datenreporte bei pathologischen Blutproben zu nennen, die für die jeweilige Tierart an Erfahrungswerten und Übung bedarf.

Zeitgleich mit dieser Studie findet eine Evaluation von Blutproben der Tierarten Hund (Dissertation Dunker) und Pferd statt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Blutproben

Zur Untersuchung werden Blutproben von insgesamt 208 Katzen aus dem Patientengut des Klinikums Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Giessen verwendet. In die Studie miteinbezogen werden sowohl gesunde Patienten (im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung oder Blutspendekatzen) als auch kranke Tiere (zum Teil mit Verlaufskontrollen).

Das Alter der Tiere beträgt 4 Monate bis 18 Jahre (Median 6 Jahre). 129 Tiere sind männlichen, 79 Tiere sind weiblichen Geschlechts.

143 Katzen gehören zur Rasse europäisch Kurzhaar. Des Weiteren sind die Rassen Siam, Maine Coon, Birma, norwegische Waldkatze, Exotik Shorthair, Perser und Britisch Kurzhaar vertreten.

Die Blutentnahme erfolgt an der V. cephalica antebrachii, der V. femoralis oder der V. jugularis.

Für die Studie werden 1,3 ml beziehungsweise 10 ml fassende K<sub>3</sub>-EDTA-antikoagulierte Röhrchen, für den Antikoagulanzenvergleich 1,3 ml fassende Li-Heparin- und Na-Citrat-Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

#### 3.2 Probenverarbeitungen

Die Verarbeitung der Blutproben erfolgt spätestens vier bis sechs Stunden nach der Blutentnahme. Es erfolgt die Messung an den Hämatologiesystemen XT-2000iV (Softwareversion 00-08) und pocH-100iV Diff (Softwareversion 00-10). Als Vergleichsmethode wird der ADVIA 2120 (Softwareversion 5.3.1.-MS.) herangezogen.

In der folgenden Tabelle finden sich technische Details zu den jeweiligen Hämatologiesystemen im Vergleich (Tabelle 3.1):



### 3. Material und Methoden

Hämatologiesystem	pochH-100iV Diff	XT-2000iV	ADVIA 2120
Softwareversion	00-10	00-08	5.3.1-MS.
Technologie	Impedanz, Zyanid-freie HGB-Messung	Fluoreszenzdurchflusszytometrie, Impedanz, Zyanid-freie HGB-Messung	Laser, Peroxidase, Zyanid-freie HGB-Messung
Modus	CBC, 3-Part Diff	CBC, 5-Part Diff, Retikulozyten-zählung	CBC, 5 Zell Diff, Retikulozyten-zählung
Parameter	WBC, RBC, HGB, HCT, MVC, MCH, MCHC, PLT, LYM%, OTHR%, EO%, LYM#, OTHR#, EO#, RDW-SD, RDW-CV, PDW*, MPV*, P-LCR* (*exkl. Katze)	WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, RDW-CV, RDW - SD, MPV, PDW, P - LCR, PCT, NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO%, BASO%, NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO#, BASO#, RET%, RET#, LFR, MFR, HFR, IRF, PLT-O	WBC, RBC, HGB (calc, meas), HCT MCV, MCH, MCHC, CHCM, RDW, HDW, absolut und %: NEUT, LYMPH, MONO, EOS, BASO, LUC, retic, reticMCV, reticCHCM, reticRDW, reticCHCM, reticHDW, PLT, MPV, PDW
Probenvolumen	15 µl	85 µl	175 µl
Messzeit	Ca.148 Sekunden	Ca.45 Sekunden	Ca. 50 Sekunden

Tabelle 3.1: Überblick über die Hämatologiesysteme

### 3. Material und Methoden

---

Bei den Geräten XT-2000iV und ADVIA 2120 wird eine Zellzählung, -differenzierung und eine Retikulozytenanalyse durchgeführt. Beim pochH-100iV Diff erfolgt jeweils eine Zellzählung und -differenzierung pro Probe.

Der jeweilige Hersteller führt die Kalibrierung der Geräte durch.

Die Geräte XT-2000iV und pochH-100iV Diff werden durch das tägliche Herauffahren (start-up) vor der Messung der Proben gereinigt und gespült. Zusätzlich findet eine tägliche Qualitätskontrolle in drei verschiedenen Levels statt. Am Ende des Messvorganges erfolgt eine erneute Reinigung der Geräte, in dem sie heruntergefahren (shut-down) werden. Die Messung der Qualitätskontrollen und das tägliche Herauf- und Herunterfahren des ADVIA 2120 wird vom Personal des Zentrallabors des Klinikums Veterinärmedizin der JLU Giessen durchgeführt.

Des Weiteren erfolgt eine Doppelbestimmung des Zentrifugenhämatokrits mittels der Hämatokritzentrifuge (Hettich Zentrifuge, Haematokrit 24) mit 12000 Umdrehungen pro Minute (5000g) für 5 Minuten.

Zur manuellen Differenzierung wird ein Blutausstrich angefertigt, luftgetrocknet und anschließend mittels panoptischer Färbung (PAN) gefärbt: Hierfür werden die Blutausstriche für 3 Minuten mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung (Nr. 1424, Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt. Nach Spülung mit Aqua destillata mit einminütiger Einwirkungsdauer erfolgt die Gegenfärbung mit Giemsa-Lösung (Nr. 9204, Fa. Merck, Darmstadt) in der Verdünnung 1 Tropfen auf 1,0 ml Aqua destillata für 15 – 20 Minuten. Nach dem letzten Färbevorgang werden die Objektträger mit Aqua destillata abgespült und erneut luftgetrocknet.

Zusätzlich zur 200-Zell-Differenzierung der Leukozyten am Mikroskop erfolgt die Beurteilung von morphologischen Zellveränderungen (zum Beispiel stabkernige neutrophile Granulozyten, lymphatische Blasten, erythroide Vorläufer) oder Thrombozytenaggregaten.

Mittels Brillantkresylblau gefärbter Blutausstriche erfolgt die manuelle Zählung der Retikulozyten. Es werden 50 µl EDTA-Vollblut mit derselben Menge der Färbelösung vermischt und 20 bis 30 Minuten inkubiert, anschließend wird ein Ausstrich angefertigt und luftgetrocknet.

Insgesamt erfolgt eine Differenzierung von 1000 Erythrozyten und eine anschließende Errechnung des Anteils der aggregierten Retikulozyten in Promille.

#### **3.3 Studienprotokoll**

Folgende Versuche werden zur Evaluation der Hämatologiesysteme XT-2000iV und pocH-100iV Diff durchgeführt.

##### 3.3.1 Methodenvergleich

Insgesamt werden 218 auswertbare Katzenblutproben an dem Gerät XT-2000iV und 150 Proben am pocH-100iV Diff gemessen. Als Referenzmethode dienen die Messung am ADVIA 2120 und die Bestimmung des Zentrifugenhämatokrits.

Zusätzlich erfolgen die manuelle Differenzierung des nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Ausstriches und eine Retikulozytenzählung der Brillantkresylblau-gefärbten Ausstriche. Die Anzahl der gezählten Leukozyten und Retikulozyten wird mit den jeweiligen Parametern der Geräte verglichen.

##### 3.3.2 Präzision innerhalb einer Serie

Zur Überprüfung der Präzision für die Messung der Zellzählung, Retikulozytenzählung und Blutzelldifferenzierung wird eine mit K<sub>3</sub>EDTA antikoagulierte Blutprobe 20 Mal hintereinander mit den Geräten XT-2000iV, pocH-100iV Diff und ADVIA 2120 gemessen. Eine Bestimmung der Präzision über verschiedene Serien hinweg wird in dieser Studie nicht durchgeführt.

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.3.3 Linearität und Verschleppung

Die Linearität und Verschleppung der Hämatologiesysteme XT-2000iV und pocH-100iV Diff werden für RBC, HGB, WBC und PLT ermittelt.

Zur Anreicherung der Erythrozyten werden 10 ml K<sub>3</sub>EDTA antikoaguliertes Blut bei Raumtemperatur für 25 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 750g zentrifugiert (Hettich Rotanta/P).

Das plättchenfreie Blutplasma wird abpipettiert und verworfen. Als 0%-Pool dient 0,9-prozentige NaCl-Lösung. Durch Vermischen des 0%-Pools mit dem Erythrozytenkonzentrat wird der 100%-Pool mit einer Gesamterythrozytenzahl von etwa  $12 \times 10^{12}/l$  hergestellt. Anschließend werden davon Verdünnungsstufen à 75%, 50% und 25% gemischt. Die Verdünnungsstufen werden direkt hintereinander gemessen. Im Anschluss erfolgt die Untersuchung der Verschleppung durch eine 100%-Pool-Messung und zwei aufeinander folgende 0%-Pool-Messungen. Diese Kombination wird jeweils vier Mal gemessen.

Zur Ermittlung der Linearität und Verschleppung von WBC und PLT werden 80 ml K<sub>3</sub>EDTA antikoaguliertes Blut 10 Minuten mit 100g (950 U/Minute, Zentrifuge: Hettich Rotanta/P) bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Der Buffy-coat und das plättchenreiche Plasma werden abpipettiert und erneut 10 Minuten mit derselben Geschwindigkeit abzentrifugiert. Aus dem Sediment und mittels 0,9-prozentiger NaCl-Lösung werden die Verdünnungsstufen (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) hergestellt und gemessen. Anschließend erfolgt die Messung der Verschleppung (siehe oben).

Um eine Anreicherung der Gesamtleukozytenzahl zu erhalten, wird wie oben beschrieben eine Blutmenge von etwa 80 ml benötigt. Diese Menge wird in dieser Studie durch Zusammenführen von vier verschiedenen Katzenblutproben erreicht.

Die Bestimmung der Linearität der Thrombozyten wird nicht durchgeführt.

#### 3.3.4 Antikoagulanzevergleich

Um den Einfluss verschiedener Antikoagulanzen auf die Messergebnisse der Geräte XT-2000iV und pocH-100iV Diff zu bestimmen, werden von 9 Katzen je ein Blutröhrchen mit K<sub>3</sub>EDTA, Li-Heparin und Na-Citrat entnommen und je drei Mal

hintereinander an den Geräten gemessen. Die Messungen sind nach maximal einer Stunde abgeschlossen.

#### 3.3.5 Blutalterung und Lagerungstemperatur

Der Einfluss der Lagerungsdauer auf die Blutproben wird bei Kühlschrank- und Raumtemperatur überprüft. Von 9 Katzen werden 16 bis 20 ml in EDTA antikoagulierte Blutröhrchen entnommen. Das Blut wird direkt nach der Entnahme zu gleichen Teilen bei 22°C und 4°C aufbewahrt. Die Messungen an den Geräten XT-2000iV (Zellzählung, Differentialblutbild und Retikulozyten) und pochH-100iV Diff (Zellzählung und Differentialblutbild) erfolgen jeweils zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden.

### 3.4 Statistik

In eine Exceltabelle findet eine Übertragung der gemessenen Daten sowie der zugehörigen Patientendaten (Rasse, Alter, Geschlecht, Diagnose), der manuellen Leukozytendifferenzierung, Retikulozytenzählung und des Zentrifugenhämatokrits statt.

#### 3.4.1 Zellzählung

Zur Auswertung der Ergebnisse der Zellzählung erfolgt die Beurteilung durch den Spearman Rangkorrelationskoeffizienten, der linearen Regression, der Passing-Bablok Regression und der Bland-Altman Analysen mit dem Statistikprogramm Microsoft Excel „Analyse-it“ (Version 2.04).

Die Ergebnisse der Zellzählung (WBC, RBC, HGB, MCV, MCHC, MCH, PLT) der Geräte XT-2000iV und pochH-100iV Diff werden jeweils mit den Ergebnissen des ADVIA 2120 verglichen. Der ADVIA 2120 gilt in dieser Studie als Referenzmethode. In der Bland-Altman-Analyse wird auf die y-Achse der Mittelwertunterschied und auf

### 3. Material und Methoden

---

die x-Achse der Mittelwert zweier Vergleichswerte, nicht der Wert der Referenzmethode, aufgetragen. Da in der Evaluation von Hämatologiesystemen die Referenzmethode nicht als Goldstandard oder „wahrer“ Wert bezeichnet werden kann, wird dies in der Bland-Altman-Analyse berücksichtigt.

Als Vergleich des Hämatokrits der Geräte wird der Mittelwert des doppelt gemessenen Zentrifugenhämatokrits herangezogen.

Aus der linearen Regression erfolgt die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten  $r$ , aus der Passing- Bablok Regression des y-Achsenabschnittes „intercept“ und der Steigung „slope“ mit 95% igem Konfidenzintervall, aus der Bland-Altman Analyse des Mittelwertunterschiedes „bias“ mit 95 %iger Übereinstimmungsgrenze.

Zusätzlich wird der Spearman Rangkorrelationskoeffizient (spearman´s rank correlation coefficient ( $r_s$ )) ermittelt.

#### 3.4.2 Differentialblutbild

Die Ergebnisse des Differentialblutbildes der Geräte XT-2000iV und pochH-100iV Diff werden mit den manuellen Differenzierungen verglichen. Dabei werden die Prozentualwerte einander gegenüber gestellt.

Da das Gerät pochH-100iV Diff die Summe von Monozyten und neutrophilen Granulozyten ermittelt (OTHR), wird diese mit der Summe aus den entsprechenden Zellen der manuellen Differenzierung verglichen.

Die Ergebnisse der Zelldifferenzierung werden mit Hilfe der linearen Regression, Passing-Bablok Regression und Bland-Altman Analysen mit dem Statistikprogramm Microsoft Excel „Analyse-it“ (Version 2.04) ausgewertet. Der Korrelationskoeffizient  $r$  sowie der Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  wird mit dem Statistikprogramm berechnet.

#### 3.4.3 Retikulozytenzählung

Die Ergebnisse der Retikulozytenzählung des Gerätes XT-2000iV werden den Resultaten der manuellen Retikulozytenanalyse gegenüber gestellt.

### 3. Material und Methoden

---

Dabei finden dieselben Analysen wie oben bei Zellzählung und Differentialblutbild erwähnt Anwendung.

#### 3.4.4 Präzision innerhalb einer Serie

Aus den ermittelten Daten werden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet.

#### 3.4.5 Linearität und Verschleppung

Die Ergebnisse der Verdünnungsstufen werden den errechneten Werten gegenüber gestellt und mittels Regressionsanalyse verglichen.

Der Verschleppungsversuch erfolgt durch eine 100%-Pool-Messung und zwei aufeinander folgende 0%-Pool-Messungen. Diese Kombination wird jeweils vier Mal gemessen.

Die Berechnung der Verschleppung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Verschleppung (\%)} = (\bar{x}_2 - \bar{x}_3) / \bar{x}_1 * 100$$

$\bar{x}_1$  = Arithmetisches Mittel der 100%-Pool-Messungen

$\bar{x}_2$  = Arithmetisches Mittel der ersten 0%-Pool-Messungen

$\bar{x}_3$  = Arithmetisches Mittel der zweiten 0%-Pool-Messungen

#### 3.4.6 Antikoagulanzenvergleich

Zur statistische Auswertung des Einflusses der Antikoagulanzen auf die Messergebnisse wird bei den angenähert normalverteilten Daten eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Antikoagulanzen“ mit Hilfe des Statistikprogramms BMDP2V herangezogen. Bei signifikanten Unterschieden fand

anschließend ein paarweiser Vergleich mit dem Student-Newman-Keuls-Verfahren statt (Dixon, 1993).

#### 3.4.7 Blutalterung und Lagerungstemperatur

Zur Bewertung der Blutalterung und Lagerungstemperatur wird eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ und „Temperatur“ hinzugezogen (Statistikprogramm BMDP2V) (Dixon, 1993). Hierbei werden die Einflüsse der Lagerungstemperatur und der Lagerungsdauer sowie deren Interaktion ermittelt (Motulsky, 2003).



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Präzisionsmessung

Die Präzisionsmessung wird in dieser Studie innerhalb einer Serie durchgeführt.

Dabei erfolgt die Berechnung der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten der Hämatologiesysteme. In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Präzisionsmessung der Blutzellzählung für die jeweiligen Hämatologiesysteme dargestellt.

#### 4.1.1 Blutzellzählung

Parameter	Einheit	ADVIA 2120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	10 <sup>9</sup> /l	6,38 +/- 0,13	1,98
RBC	10 <sup>12</sup> /l	7,47 +/- 0,03	0,40
HGB	mmol/l	7,90 +/- 0,07	0,83
HCT	l/l	0,29 +/- 0,0021	0,71
MCV	fl	39,09 +/- 0,28	0,71
MCH	fmol	1,06 +/- 0,01	0,76
MCHC	mmol/l	27,04 +/- 0,30	1,10
PLT	10 <sup>9</sup> /l	75,87 +/- 5,24	6,90

*Tabelle 4.1: Präzision des ADVIA 2120 für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung*

## 4. Ergebnisse

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	10 <sup>9</sup> /l	6,23 +/- 0,10	1,54
RBC	10 <sup>12</sup> /l	7,79 +/- 0,04	0,45
HGB	mmol/l	10,25 +/- 0,06	0,59
HCT	l/l	0,38 +/- 0,002	0,42
MCV	fl	48,89 +/- 0,15	0,31
MCH	fmol	1,32 +/- 0,01	0,66
MCHC	mmol/l	26,91 +/- 0,17	0,65
PLT	10 <sup>9</sup> /l	92,24 +/- 6,69	7,26

*Tabelle 4.2: Präzision des XT-2000iV für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung*

Parameter	Einheit	poch-100iV Diff	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	10 <sup>9</sup> /l	14,14 +/- 0,52	3,71
RBC	10 <sup>12</sup> /l	10,96 +/- 0,09	0,80
HGB	mmol/l	13,83 +/- 0,17	1,24
HCT	l/l	0,44 +/- 0,003	0,78
MCV	fl	39,73 +/- 0,19	0,47
MCH	fmol	1,26 +/- 0,19	1,54
MCHC	mmol/l	31,77 +/- 0,41	1,28
PLT	10 <sup>9</sup> /l	210,90 +/- 250,18	118,62

*Tabelle 4.3: Präzision des poch-100iV Diff für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung;*

*für diese Messung wird eine andere Probe verwendet als für die beiden anderen Geräte, da die erste Probe zu viele Fehlermeldungen zeigt und somit eine 20 fach-Messung nicht möglich macht.*

## 4. Ergebnisse

---

### 4.1.2 Blutzelldifferenzierung

Auf Grund von Thrombozytenaggregaten, die mit Leukozyten interferieren, ist eine Differenzierung beim pocH-100iV Diff in einem von 20 Fällen nicht möglich. Die Standardabweichung und der Variationskoeffizient werden daraus errechnet. Folgend sind die Präzisionsmessungen der Blutzelldifferenzierung des AVDIA 2120, XT-2000iV und pocH-100iV Diff dargestellt. Die absoluten und prozentualen Werte werden einander gegenüber gestellt.

## 4. Ergebnisse

Parameter	Einheit	ADVIA 2120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile Granulozyten	%	57,49 +/- 5,12	8,90
Neutrophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	3,67 +/- 0,31	8,41
Lymphozyten	%	20,93 +/- 2,11	10,10
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	1,34 +/- 0,15	11,12
Monozyten	%	3,05 +/- 0,37	11,99
Monozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,20 +/- 0,02	12,17
Eosinophile Granulozyten	%	18,37 +/- 3,92	21,37
Eosinophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	1,17 +/- 0,26	21,82

*Tabelle 4.4: Präzision des ADVIA 2120 für die Parameter der Blutzelldifferenzierung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung*

## 4. Ergebnisse

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile Granulozyten	%	59,25 +/- 0,70	1,18
Neutrophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	3,69 +/- 0,07	1,82
Lymphozyten	%	25,36 +/- 0,67	2,65
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	1,58 +/- 0,05	3,28
Monozyten	%	5,47 +/- 0,42	7,72
Monozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,34 +/- 0,03	7,81
Eosinophile Granulozyten	%	9,91 +/- 0,44	4,45
Eosinophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,61 +/- 0,03	4,72

*Tabelle 4.5: Präzision des XT-2000iV für die Parameter der Blutzelldifferenzierung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung*

## 4. Ergebnisse

Parameter	Einheit	pochH-100iV Diff	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Lymphozyten	%	50,69 +/- 1,57	3,10
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	7,16 +/- 0,44	6,13
Eosinophile Granulozyten	%	7,18 +/- 0,94	13,05
Eosinophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	1,02 +/- 0,12	12,08
OTHR (Neutrophile und Monozyten)	%	42,16 +/- 1,71	4,05
OTHR (Neutrophile und Monozyten)	10 <sup>9</sup> /l	5,95 +/- 0,26	4,35

*Tabelle 4.6: Präzision pochH-100iV Diff für die Parameter der Blutzelldifferenzierung der Tierart Katze, n=1; 19 fach- Messung*

## 4. Ergebnisse

### 4.1.3 Retikulozytenzählung

Die Resultate der Präzisionsmessung der Retikulozyten sind in folgenden Tabellen aufgestellt.

Parameter	Einheit	ADVIA 2120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Retikulozyten	%	0,41 +/- 0,06	15,66
Retikulozyten	10 <sup>9</sup> /l	30,54 +/- 4,64	15,18

*Tabelle 4.7: Präzision des ADVIA 2120 für die Retikulozytenzählung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung*

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Retikulozyten	%	0,62 +/- 0,07	11,72
Retikulozyten	10 <sup>9</sup> /l	48,69 +/- 5,74	11,80

*Tabelle 4.8: Präzision des XT-2000iV für die Retikulozytenzählung der Tierart Katze, n=1; 20 fach- Messung*

## 4. Ergebnisse

### 4.2 Verschleppung

Der Verschleppungsversuch der Hämatologiesysteme XT-2000iV und pocH-100iV Diff hat folgende Ergebnisse erzielt:

Parameter	Verschleppung (%)	
	XT-2000iV	pocH-100iV Diff
WBC	0	0
PLT	0,1	0
RBC	0,08	0
HGB	0	0

*Tabelle 4.9: Ergebnisse der Verschleppung der WBC, PLT, RBC und HGB der Geräte XT-2000iV und pocH-100iV Diff*

### 4.3 Linearität

Die Bestimmung der Linearität ist in nachfolgenden Tabellen dargestellt:

Linearität XT-2000iV					
Parameter	Einheit	Messbereich	r	Intercept	Slope
RBC	$10^{12}/l$	0 bis 12,82	1	-0,01	0,97
HGB	mmol/l	0 bis 18,2	1	0,04	1
WBC	$10^9/l$	0 bis 42,64	1	0,24	1,01

*Tabelle 4.10: Ergebnisse der Regressionsanalyse der Linearitätsmessung für die Parameter RBC, HGB, WBC am XT-2000iV*



## 4. Ergebnisse

<b>Linearität pocH-100iV Diff</b>					
Parameter	Einheit	Messbereich	r	Intercept	Slope
RBC	$10^{12}/l$	0 bis 12,69	1	-0,03	1
HGB	mmol/l	0 bis 17,9	1	0,16	1
WBC	$10^9/l$	0 bis 44,7	1	-0,42	1

*Tabelle 4.11: Ergebnisse der Regressionsanalyse der Linearitätsmessung für die Parameter RBC, HGB, WBC am pocH-100iV Diff*

Die Linearitätsmessungen der Parameter RBC, HGB, WBC haben alle einen Korrelationskoeffizienten von 1. Für den angegebenen Messbereich sind der Y-Achsenabschnitt nahe null und die Steigung nahe 1. Die Linearität der Thrombozyten wird in dieser Studie nicht bestimmt.

### 4.4 Methodenvergleich

#### 4.4.1 Zellzählung

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs der Zellzählung des XT-2000iV beziehungsweise pocH-100iV Diff mit dem ADVIA 2120 aufgeführt.

## 4. Ergebnisse

<b>XT-2000iV</b>							
Parameter	Einheit	N	r	r <sub>s</sub>	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
WBC	10 <sup>9</sup> /l	214	0,99	1,00	1,01 (1,00 bis 1,02)	0,07 (-0,005 bis 0,18)	0,18 (-1,02 bis 1,38)
RBC	10 <sup>12</sup> /l	216	0,99	0,98	1,11 (1,09 bis 1,12)	-0,37 (-0,52 bis -0,24)	0,46 (-0,24 bis 1,17)
HGB	mmol/l	210	0,99	0,99	0,82 (0,81 bis 0,83)	-0,03 (-0,10 bis 0,53)	-1,72 (-2,7 bis -0,8)
HCT	l/l	216	0,96	0,96	1,12 (1,08 bis 1,17)	-0,03 (-0,04 bis -0,01)	0,00 (0,03 bis 0,07)
MCH	fmol/l	210	0,96	0,96	0,72 (0,69 bis 0,74)	0,05 (0,03 bis 0,09)	-0,26 (-0,3 bis -0,2)
MCHC	mmol/l	211	0,42	0,37	0,98 (0,80 bis 1,21)	-6,92 (-12,79 bis -2,01)	-7,25 (-10,01 bis -4,49)
MCV	fl	215	0,87	0,88	1,29 (1,19 bis 1,40)	-9,59 (-14,20 bis -5,65)	2,58 (-2,75 bis -7,90)
PLT	10 <sup>9</sup> /l	216	0,89	0,89	0,93 (0,89 bis 0,97)	8,44 (1,97 bis -45,98)	3,8 (-142,7 bis 150,4)

*Tabelle 4.12: Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA 2120 für die Parameter der Blutzellzählung; der HCT des XT-2000iV wird mit dem Zentrifugenhämatokrit verglichen; r aus Linearer Regression; r<sub>s</sub> (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); y Achsenabschnitt ( Intercept) und Steigung (Slope) aus „Passing Bablok Regression“; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

## 4. Ergebnisse

---

Im Vergleich der Hämatologiesysteme XT-2000iV und ADVIA 2120 weisen die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT und MCH sehr gute bis exzellente Korrelationskoeffizienten zwischen 0,96 und 0,99 auf. Anhand der Steigung von 0,82 beim Parameter Hämoglobin wird der proportionale Fehler deutlich. Dies ist ebenso bei den Parametern RBC, HCT und MCH der Fall. Für den Parameter MCHC ist die Korrelation ungenügend und der bias im negativen Bereich. MCV und PLT haben befriedigende Korrelationskoeffizienten. Anhand der 95%igen Übereinstimmungsgrenze der Bland-Altman-Analyse wird bei der Thrombozytenzählung die Streuung sowohl in den positiven als auch in den negativen Bereich sichtbar.

## 4. Ergebnisse

<b>pocH-100iV Diff</b>							
Parameter	Einheit	N	r	r <sub>s</sub>	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
WBC	10 <sup>9</sup> /l	135	0,95	0,95	1,02 (0,98 bis 1,07)	0,10 (-0,31 bis 0,51)	0,71 (-3,75 bis 5,17)
RBC	10 <sup>12</sup> /l	148	0,97	0,96	1,08 (1,04 bis 1,11)	-0,33 (-0,61 bis -0,10)	0,30 (-0,59 bis 1,18)
HGB	mmol/l	147	0,97	0,96	0,77 (0,75 bis 0,78)	0,35 (0,21 bis 0,53)	-1,81 (-3 bis -0,6)
HCT	l/l	152	0,96	0,95	1,02 (0,98 bis 1,07)	-0,01 (-0,02 bis 0,01)	0,00 (-0,05 bis 0,05)
MCH	fmol/l	148	0,94	0,94	0,78 (0,73 bis 0,83)	0,00 (-0,05 bis 0,05)	-0,25 (-0,3 bis -0,2)
MCHC	mmol/l	148	0,41	0,32	1,03 (0,82 bis 1,33)	-7,54 (-15,52 bis -1,65)	-6,62 (9,1 bis -4,2)
MCV	fl	150	0,87	0,89	1,04 (0,95 bis 1,14)	-0,20 (-4,26 bis -3,36)	1,53 (-2,79 bis 5,84)
PLT	10 <sup>9</sup> /l	143	0,26	0,50	1,20 (1,01 bis 1,51)	-94,58 (-166,07 bis -45,98)	48,0 (-597,4 bis 693,3)

*Tabelle 4.13: Methodenvergleich des pocH-100iV Diff mit dem ADVIA 2120 für die Parameter der Blutzellzählung; der HCT des pocH-100iV Diff wird mit dem Zentrifugenhämatokrit verglichen; r aus Linearer Regression; r<sub>s</sub> (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); Intercept und Slope aus "Passing Bablok Regression"; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

## 4. Ergebnisse

Betrachtet man die Resultate des poch100iV Diff im Vergleich mit dem ADVIA 2120, fallen sehr gute Korrelationskoeffizienten für die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT und MCH auf. Ein proportionaler Fehler tritt bei HGB, MCH und MCHC auf. Schlechte Korrelationskoeffizienten sind bei den Parametern PLT und MCHC zu verzeichnen.

Auf den folgenden Diagrammen sind Beispiele für eine optimale Übereinstimmung sowie für einen proportionalen Fehler zwischen zwei Messgeräten aufgeführt. Sowohl der Vergleich der Gesamtleukozytenzahl (WBC) als auch der Vergleich des Hämoglobins zwischen XT-2000iV und ADVIA 2120 sind mit einem exzellenten Korrelationskoeffizienten von 0,99 aufgefallen. Anhand dieser Beispiele soll verdeutlicht werden, dass eine alleinige Beurteilung der Daten anhand des Korrelationskoeffizienten nicht möglich ist. Ohne die Betrachtung der Hauptkomponentengleichung ( $y=ax+b$ ) würde man einen proportionalen Fehler übersehen.

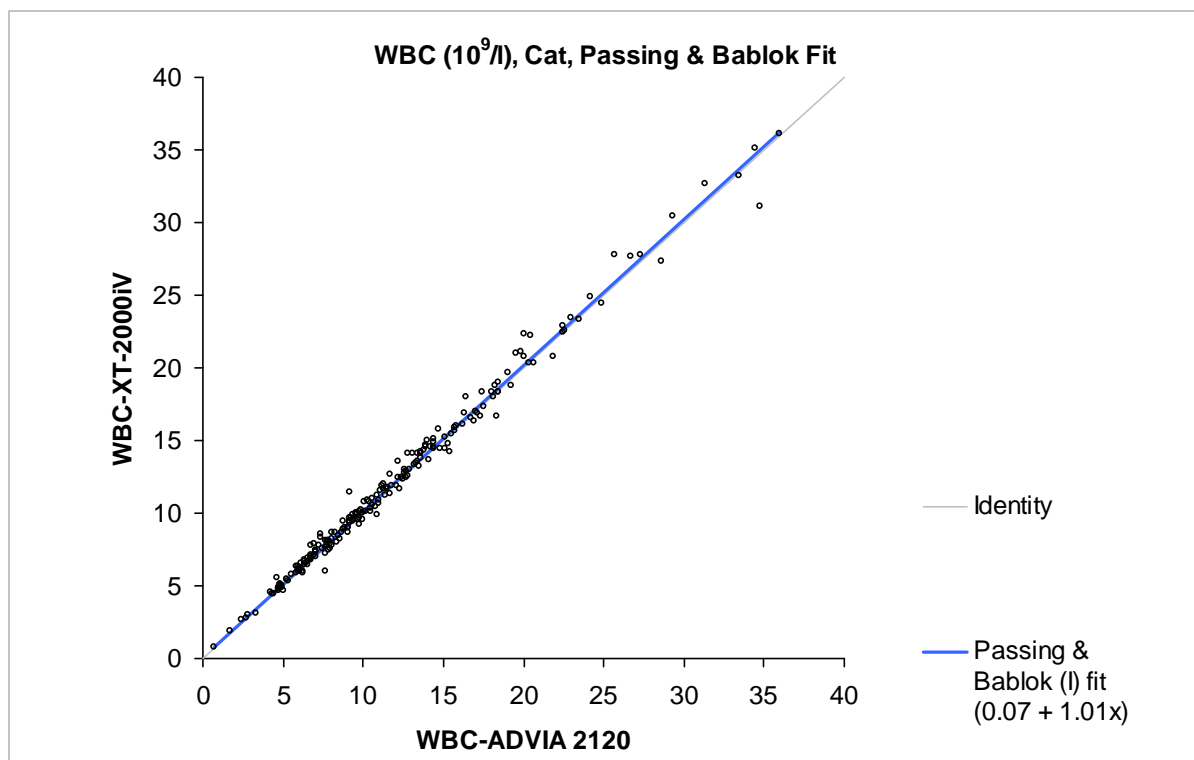


Abbildung 4.1: Passing und Bablok Regression der Leukozytenzählung, Vergleich ADVIA 2120 mit XT-2000iV. Nahezu alle Messwerte liegen in der Nähe der Winkelhalbierenden. Dies spricht für eine optimale Übereinstimmung der Ergebnisse

## 4. Ergebnisse

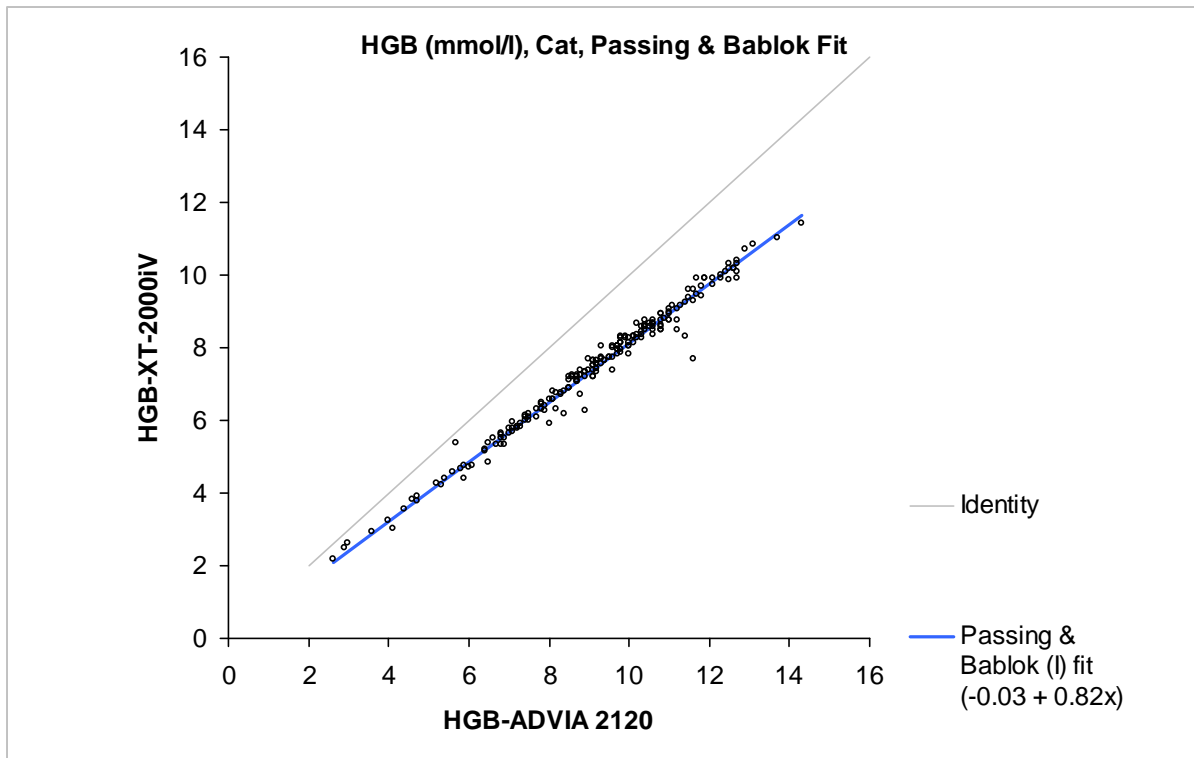


Abbildung 4.2: Passing und Bablok Regression der Hämoglobinemessung, Vergleich ADVIA 2120 mit XT-2000iV. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,99. Anhand des Regressionsdiagramms wird ein proportionaler Fehler sichtbar, das heißt die höheren Messwerte divergieren stärker

Die gesamten Diagramme der Ergebnisse der Zellzählung finden sich im Anhang.

### 4.4.2 Differentialblutbild

Im Methodenvergleich des Differentialblutbildes werden die Resultate des XT-2000iV beziehungsweise pocH-100iV Diff mit der manuellen Leukozytendifferenzierung verglichen. Zur manuellen Differenzierung werden Blutausstriche, die mit einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung gefärbt werden, herangezogen. Je Blutausstrich werden 200 Leukozyten differenziert.

## 4. Ergebnisse

<b>XT-2000iV</b>							
Parameter	Einheit	N	r	$r_s$	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
Neutro- phile Granulo- zyten	%	202	0,88	0,91	1,00 (0,96 bis 1,05)	-3,70 (-6,64 bis -0,56)	-4,14 (-21,50 bis 13,22)
Lympho- zyten	%	202	0,90	0,91	1,00 (0,95 bis 1,05)	1,60 (0,28 bis 2,59)	1,68 (-12,38 bis 15,75)
Monozyten	%	205	0,37	0,44	1,14 (0,96 bis 1,40)	1,43 (0,70 bis 1,72)	2,49 (-7,75 bis 12,74)
Eosino- phile Granulo- zyten	%	204	0,90	0,88	0,94 (0,86 bis 1,03)	0,33 (0,19 bis 0,47)	0,04 (-3,97 bis 4,05)

*Tabelle 4.14: Methodenvergleich der Parameter der Blutzelldifferenzierung des XT-2000iV mit der manuellen Leukozytendifferenzierung von 200 Zellen; r aus linearer Regression;  $r_s$  (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); Intercept und Slope aus „Passing Bablok Regression“; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

Aus Tabelle 4.14 geht hervor, dass die Korrelationskoeffizienten der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie der Lymphozyten zufrieden stellend sind. Für die Monozyten liegt eine schlechte Korrelation vor.

## 4. Ergebnisse

<b>pochH-100iV Diff</b>							
Parameter	Einheit	N	r	r <sub>s</sub>	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
OTHR	%	103	0,88	0,89	1,04 (0,95 bis 1,15)	-8,51 (-15,57 bis -2,08)	-6,15 (-23,71 bis 11,40)
Lympho- zyten	%	103	0,87	0,88	1,11 (1,01 bis 1,20)	1,81 (-0,21 bis 4,95)	5,68 (-10,30 bis 21,66)
Eosino- phile Granulo- zyten	%	102	0,73	0,71	0,78 (0,67 bis 0,92)	1,65 (0,98 bis 2,13)	0,89 (-5,52 bis 7,31)

*Tabelle 4.15: Methodenvergleich der Parameter der Blutzelldifferenzierung des pochH-100iV Diff mit der manuellen Leukozytendifferenzierung von 200 Zellen; r aus linearer Regression; r<sub>s</sub> (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); Intercept und Slope aus "Passing Bablok Regression"; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

Der pochH-100iV Diff zeigt eine mäßige bis gute Korrelation mit der manuellen Differenzierung. Mittels Impedanzmethode dieses Hämatologiegerätes werden allerdings bei 50 von 153 Proben die Leukozyten nicht differenziert. Diese Proben werden mit „\*000“ oder „---“ gekennzeichnet.



## 4. Ergebnisse

<b>ADVIA 2120</b>							
Parameter	Einheit	N	r	r <sub>s</sub>	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
Neutro- phile Granulo- zyten	%	202	0,89	0,90	1,00 (0,95 bis 1,06)	-3,57 (-7,87 bis 0,35)	-3,88 (-19,96 bis 12,20)
Lympho- zyten	%	202	0,93	0,92	1,02 (0,97 bis 1,07)	2,79 (1,44 bis 3,77)	2,8 (-8,67 bis 14,26)
Monozyten	%	202	0,40	0,44	0,58 (0,47 bis 0,72)	0,95 (0,74 bis 1,20)	0,74 (-11,52 bis 12,99)
Eosino- phile Granulo- zyten	%	202	0,80	0,80	1,00 (0,91 bis 1,13)	0,20 (0,00 bis 0,55)	0,43 (-5,18 bis 6,03)

*Tabelle 4.16: Methodenvergleich der Parameter der Blutzelldifferenzierung des ADVIA 2120 mit der manuellen Leukozytendifferenzierung von 200 Zellen; r aus linearer Regression; r<sub>s</sub> (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); Intercept und Slope aus "Passing Bablok Regression"; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

Der ADVIA 2120 weist im Vergleich zum XT-2000iV vergleichbare Werte auf.

### 4.4.3 Retikulozytenzählung

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs der Retikulozytenzählung werden in den unten stehenden Tabellen zusammengefasst:

## 4. Ergebnisse

<b>XT-2000iV, Referenzmethode: manuell</b>							
Parameter	Einheit	N	R	$r_s$	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
Retikulo- zyten	$10^{12}/l$	225	0,69	0,52	2,37 (1,93 bis 3,16)	0,04 (0,03 bis 0,04)	0,10 (-0,03 bis 0,14)
Retikulo- zyten	%	224	0,81	0,56	2,18 (1,84 bis 2,70)	0,43 (0,41 bis 0,49)	0,66 (-0,716 bis 2,044)

*Tabelle 4.17: Methodenvergleich der Retikulozytenzählung des XT-2000iV mit der manuellen Retikulozytenzählung;  $r$  aus linearer Regression;  $r_s$  (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); Intercept und Slope aus "Passing Bablok Regression"; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

<b>XT-2000iV, Referenzmethode: ADVIA 2120</b>							
Parameter	Einheit	N	R	$r_s$	Slope (95 % CI)	Intercept (95% CI)	Bias (95% Limits of agreement)
Retikulo- zyten	$10^{12}/l$	221	0,73	0,70	2,37 (2,06 bis 2,73)	0,001 (0,00 bis 0,001)	0,05 (-0,04 bis 0,13)
Retikulo- zyten	%	215	0,84	0,70	2,00 (1,80 bis 2,33)	0,14 (0,44 bis 0,20)	0,55 (-1 bis 2,1)

*Tabelle 4.18: Methodenvergleich der Retikulozytenzählung des XT-2000iV mit der Retikulozytenzählung des ADVIA 2120;  $r$  aus linearer Regression;  $r_s$  (Spearman Rangkorrelationskoeffizient); Intercept und Slope aus "Passing Bablok Regression"; Verzerrung (Bias) aus „Bland Altman“ Analyse*

Im Vergleich der Retikulozyten des XT-2000iV mit dem ADVIA 2120 wird ein proportionaler Fehler sichtbar. Da die Steigung (slope)  $>1$  ist, sind die Ergebnisse der Retikulozytenzählung des XT-2000iV höher als die des ADVIA 2120.

## 4. Ergebnisse

### 4.5 Antikoagulanzvergleich

Der Einfluss der verschiedenen Antikoagulanzen K-EDTA, Li-Heparin und Na-Citrat wird an den Geräten XT-2000iV und pocH-100iV Diff gemessen. Dafür werden Blutproben von 9 Katzen verwendet.

Die errechnete Signifikanz  $p$  mit der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen zeigt an, ob alle Vergleichsdaten der drei Antikoagulanz-Gruppen mit der Nullhypothese vereinbar sind oder nicht, das heißt, ob ihre Werte divergieren. Von einem signifikanten Unterschied der Durchschnittswerte wird ab  $p < 0,05$  gesprochen (Petrie und Watson, 2006).

Parameter	Einheit	Signifikanz (p) pocH-100iV Diff	Signifikanz (p) XT-2000iV
WBC*	$10^9/l$	0,35	0,19
RBC	$10^{12}/l$	0,97	0,35
HGB	mmol/l	0,89	0,54
HCT	l/l	0,94	0,25
MCV	Fl	0,029	0,31
MCH	Fmol	0,12	0,27
MCHC	mmol/l	0,53	0,048
PLT*	$10^9/l$	0,43	0,78
Retikulozyten	$10^9/l$	--	0,48

*Tabelle 4.19: Resultate der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen zum Vergleich der Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzellzählung des pocH-100iV Diff und Sysmex XT-2000iV, n=9. \*Daten logarithmiert, da sie nicht normalverteilt sind*

Parameter	Einheit	Signifikanz (p)	Signifikanz (p)
-----------	---------	-----------------	-----------------

## 4. Ergebnisse

		pocH-100iV Diff	XT-2000iV
Neutrophile	10 <sup>9</sup> /l	--	0,31
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	--	0,0036
Monozyten	10 <sup>9</sup> /l	--	0,033
Eosinophile	10 <sup>9</sup> /l	--	0,34

*Tabelle 4.20: Resultate der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen zum Vergleich der Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzelldifferenzierung des Sysmex XT-2000iV, n=9, alle Daten sind logarithmiert*

Aus den Tabellen 4.19 und 4.20 lässt sich entnehmen, dass beim pocH-100iV Diff die Messung des MCV, beim XT-2000iV die des MCHC, der Lymphozyten und Monozyten signifikante Unterschiede zwischen den Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li-Heparin und Na- Citrat aufweisen.

Die signifikanten Resultate werden mit dem Student-Newman-Keuls-Verfahren verglichen. Die Messung der MCHC (XT-2000iV) ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Antikoagulanzen EDTA und Heparin, die Messung der Lymphozyten (logarithmiert, XT-2000iV) einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen Heparin und Citrat sowie einen hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) Unterschied zwischen EDTA und Heparin. Die Monocyten (logarithmiert, XT-2000iV) weisen einen signifikanten Unterschied zwischen EDTA und Heparin auf. Die Variable MCV (pocH-100iV Diff) ist für die Antikoagulanzen EDTA und Heparin sowie EDTA und Citrat signifikant unterschiedlich.

Auf Grund von Fehlermeldungen beispielsweise durch Thrombozytenaggregate ist die Beurteilung des Differentialblutbildes des pocH-100iV Diff im Antikoagulanzenvergleich nicht möglich.

### 4.6 Lagerungs- und Verlaufsuntersuchungen

Durch die Lagerungs- und Verlaufsuntersuchungen soll der Einfluss der Lagerungstemperatur und der Lagerungsdauer auf die Messergebnisse ermittelt werden. Dies spielt vor allem beim XT-2000iV als Hämatologiesystem für Einsendelabore eine Rolle. Hierfür werden 9 mit K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulierte Katzenblutproben jeweils bei 22°C und 4°C gelagert. Die Messungen erfolgen 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden nach der Blutentnahme. Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen für die Zellzählung, das Differentialblutbild und die Retikulozyten werden in den Tabellen 4.23 bis 4.26 aufgelistet.

#### 4.6.1 Zellzählung XT-2000iV

Lagerungsversuch XT-2000iV			
Parameter	Signifikanz P Lagerungszeit	Signifikanz P Lagerungstemperatur	Signifikanz P Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und -dauer
WBC	0,019	0,98	0,11
RBC	0,28	0,55	0,81
HGB	0,61	0,38	0,63
HCT	0,0000	0,096	0,033
MCV	0,0000	0,0002	0,0000
MCH	0,55	0,18	0,26
MCHC	0,0000	0,0002	0,0000
PLT*	0,0000	0,0000	0,1081

*Tabelle 4.21: Einfluss der Lagerungsdauer und der –temperatur auf die Messergebnisse der Blutzellzählung, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze*

*\* auf Grund fehlender Daten für zwei 72h-Werte kann ein Two-way-ANOVA nicht durchgeführt werden. Hiefür wird der Wald Test mit n=7 angewandt.*

Anhand der Tabelle 4.21 wird sichtbar, dass vor allem die Lagerungszeit einen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Die Leukozytenzahl (WBC), der Hämatokrit

## 4. Ergebnisse

---

(HCT), das mittlere Zellvolumen (MCV), die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) sowie die Thrombozytenzahl (PLT) weisen einen signifikanten Unterschied im Verlauf der Messungen innerhalb der 72 Stunden auf. Bei den Parametern MCV, MCHC, PLT zeigt auch die Lagerungstemperatur einen signifikanten Unterschied.

Bei den Parametern HCT, MCV und MCHC wird ein signifikanter Einfluss der Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und -dauer deutlich.

Der Einfluss der Lagerungstemperatur ist anhand der Abbildungen 4.3 bis 4.21 deutlicher zu sehen:

WBC, RBC HGB und MCH verändern sich im Laufe der Messungen nicht, auch die unterschiedliche Lagerungstemperatur beeinflusst die Werte innerhalb von 72 Stunden nicht wesentlich.

Hingegen der Hämatokrit und MCV steigen, MCHC fällt deutlich ab dem Messzeitpunkt von 6 Stunden ab. Hinzu kommt, dass die bei Raumtemperatur gelagerten Blutproben mehr vom Ausgangswert abweichen.

Die Thrombozytenzahl verändert sich bei Raumtemperatur bereits ab 3 Stunden, bei Kühlschranktemperatur ist ab dem 12-Stunden-Wert ein Anstieg sichtbar. Bei den kühl gelagerten Proben bleibt die Thrombozytenzahl allerdings zu jedem Zeitpunkt deutlich konstanter.

#### 4. Ergebnisse

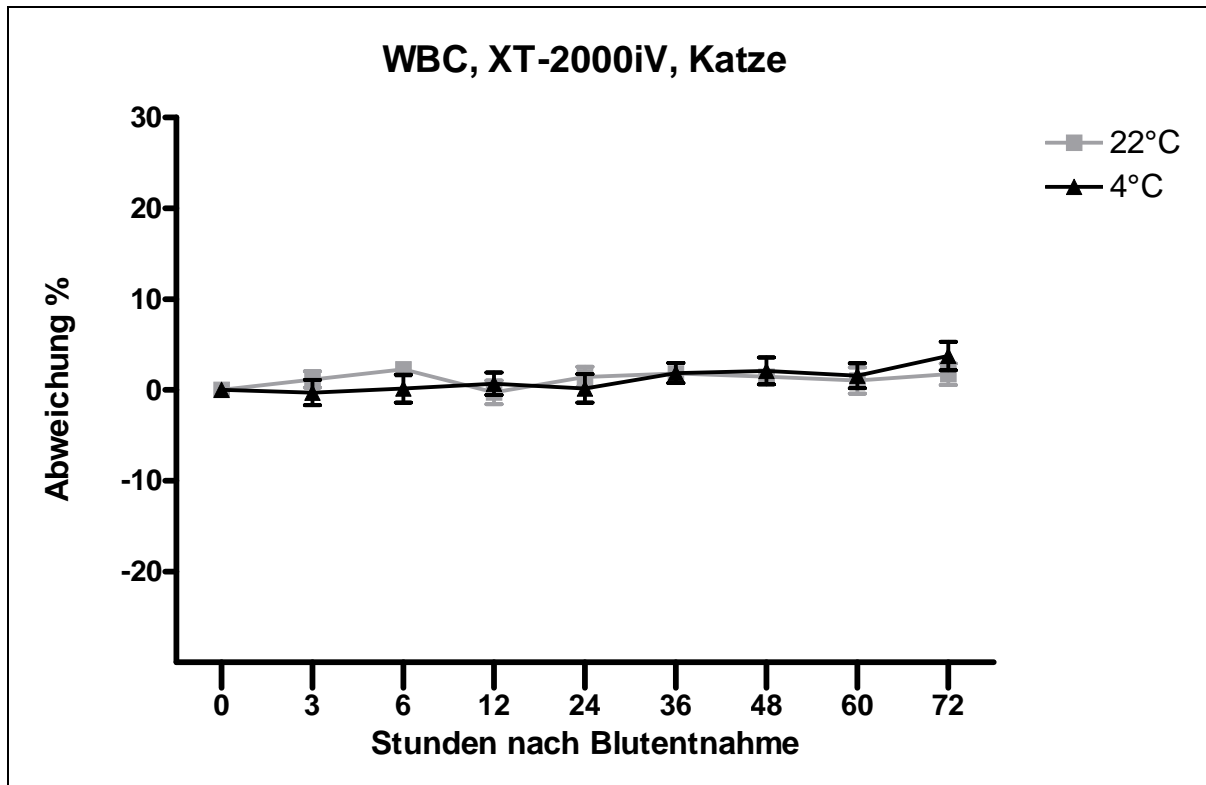


Abbildung 4.3: Prozentuale Abweichung der Leukozytenzahl im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

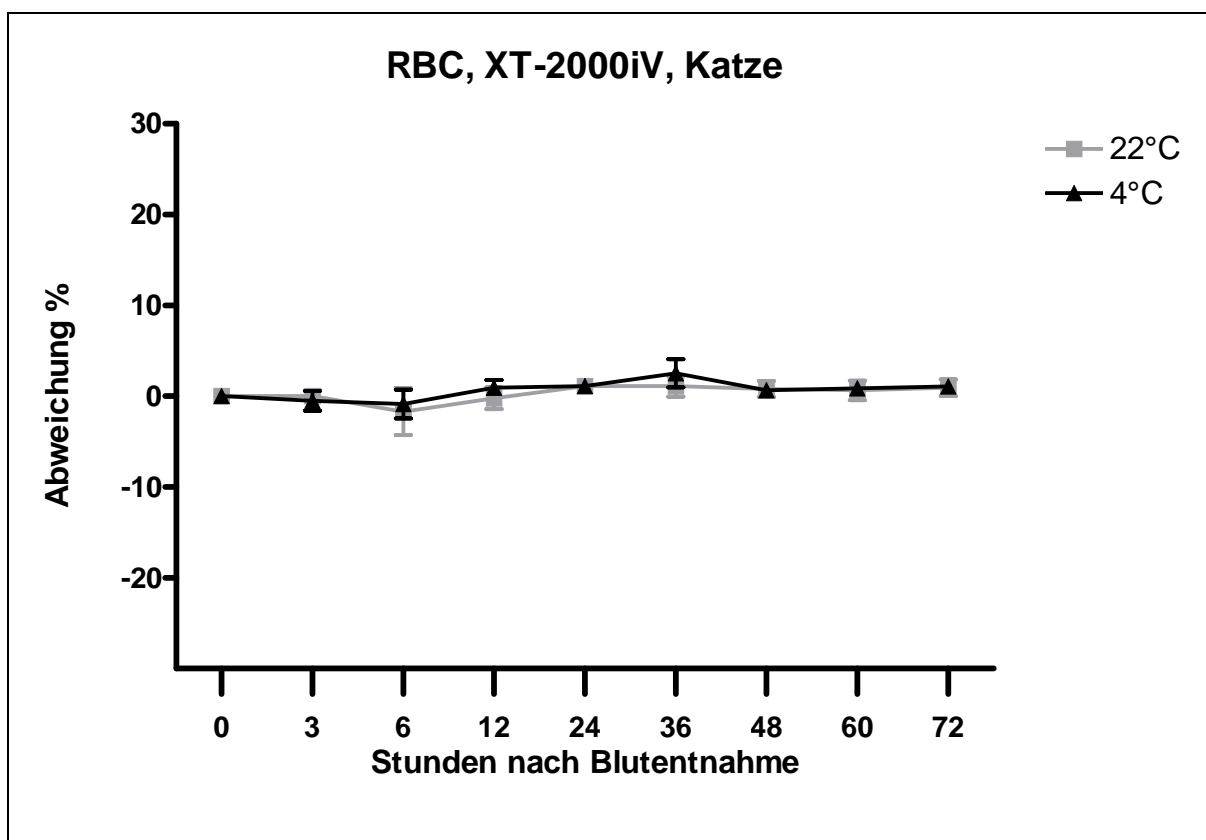


Abbildung 4.4: Prozentuale Abweichung der Erythrozytenzahl im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

#### 4. Ergebnisse

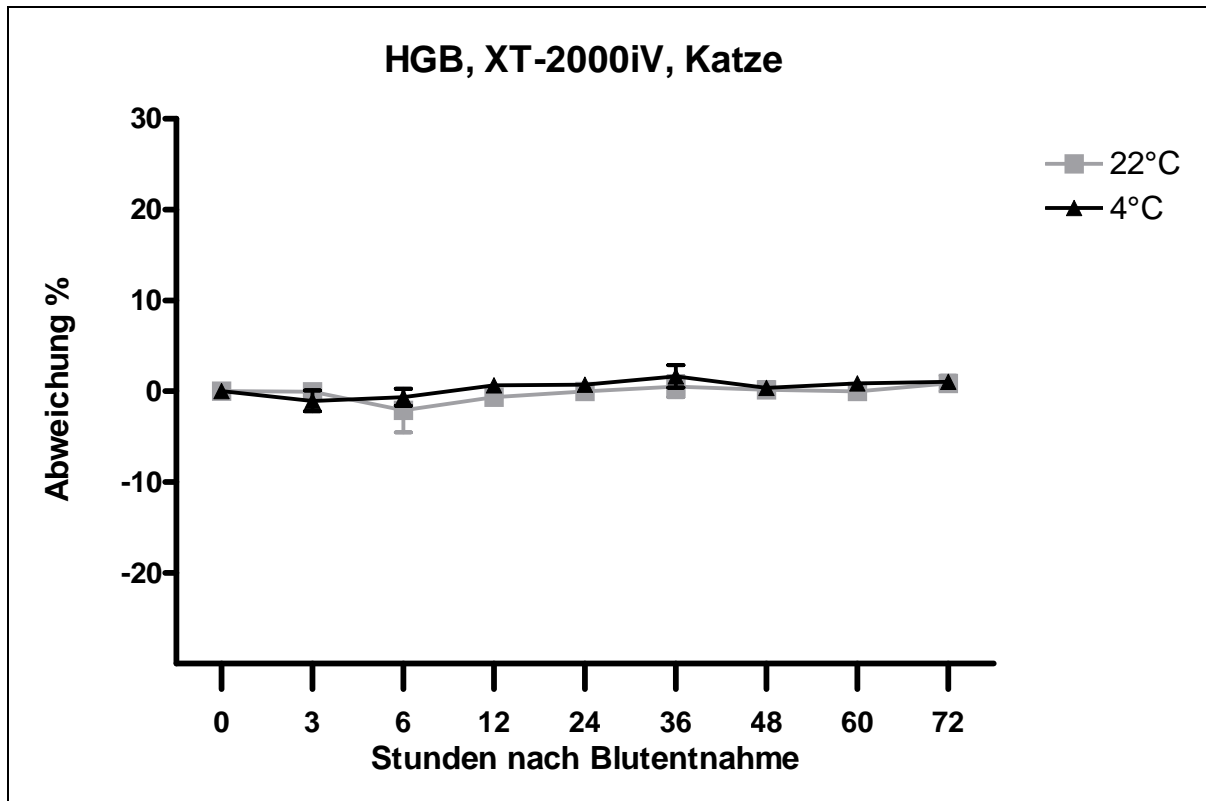


Abbildung 4.5: Prozentuale Abweichung des Hämoglobingehaltes im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

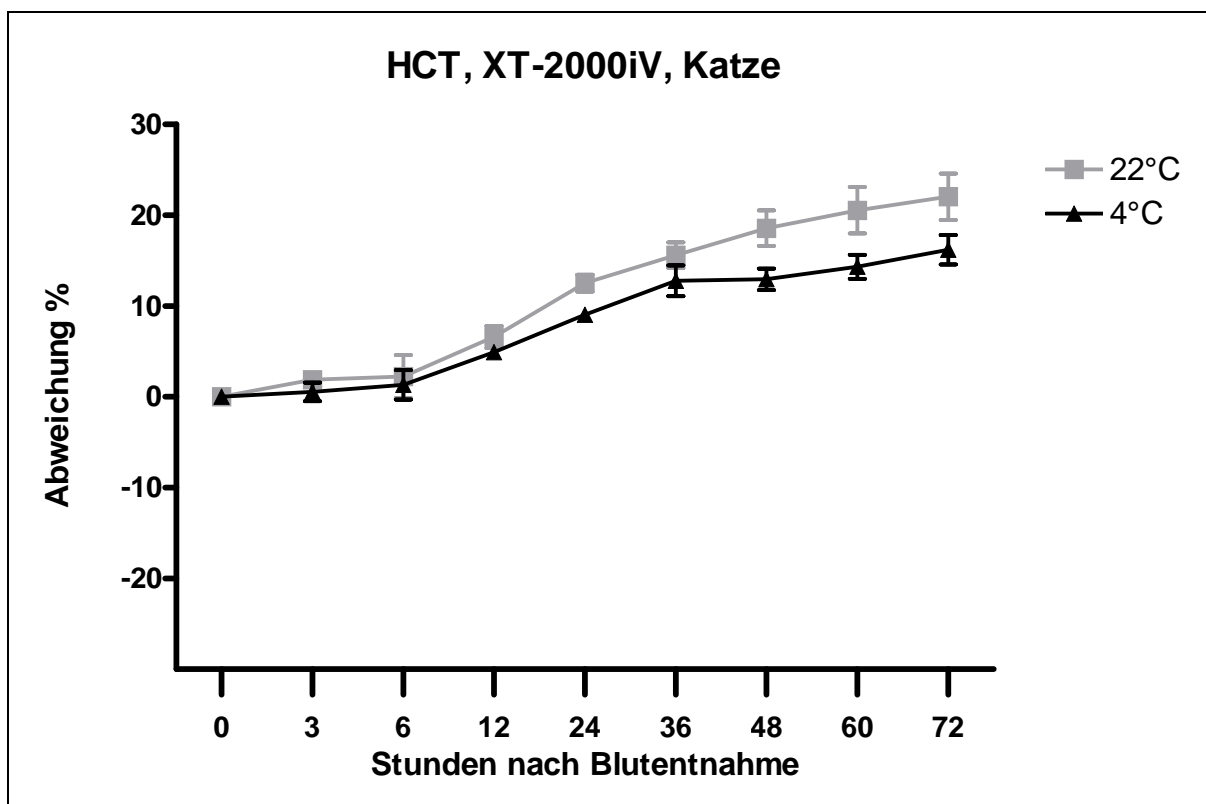


Abbildung 4.6: Prozentuale Abweichung des Hämatokrits im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze



#### 4. Ergebnisse

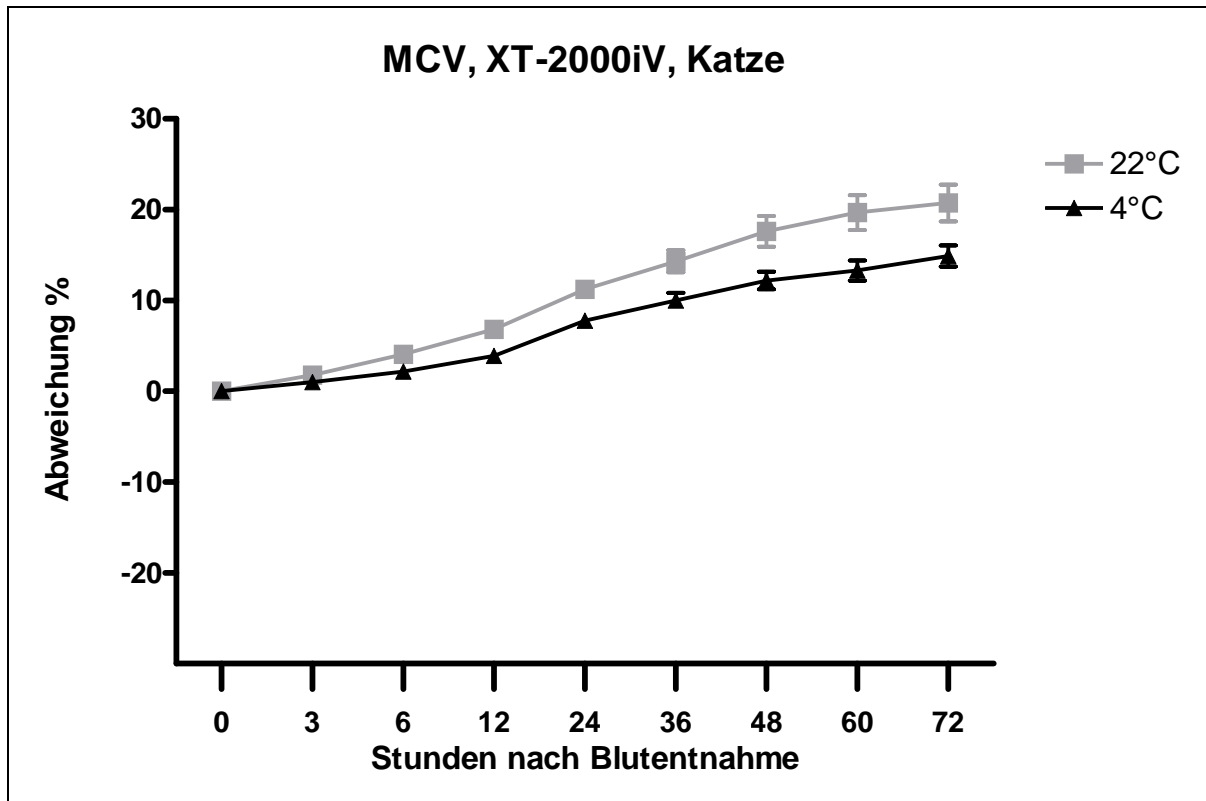


Abbildung 4.7: Prozentuale Abweichung des MCV im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

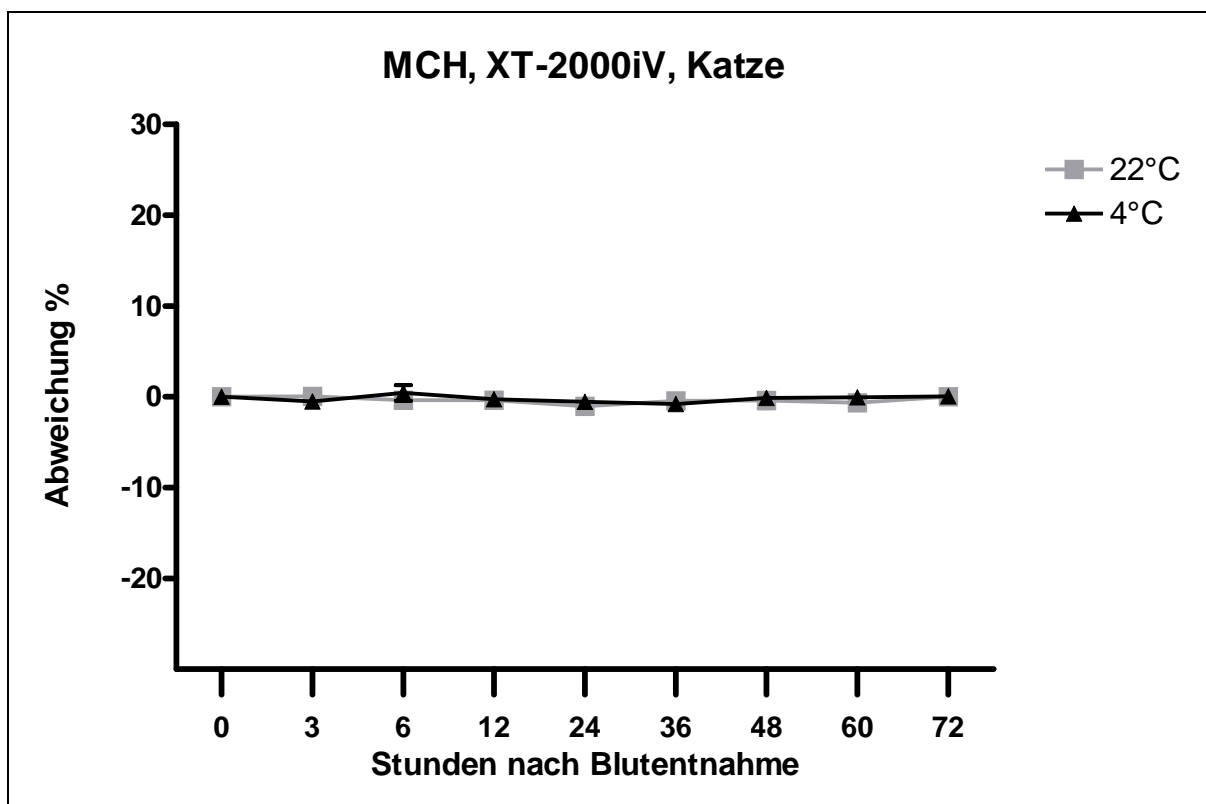


Abbildung 4.8: Prozentuale Abweichung des MCH im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

#### 4. Ergebnisse

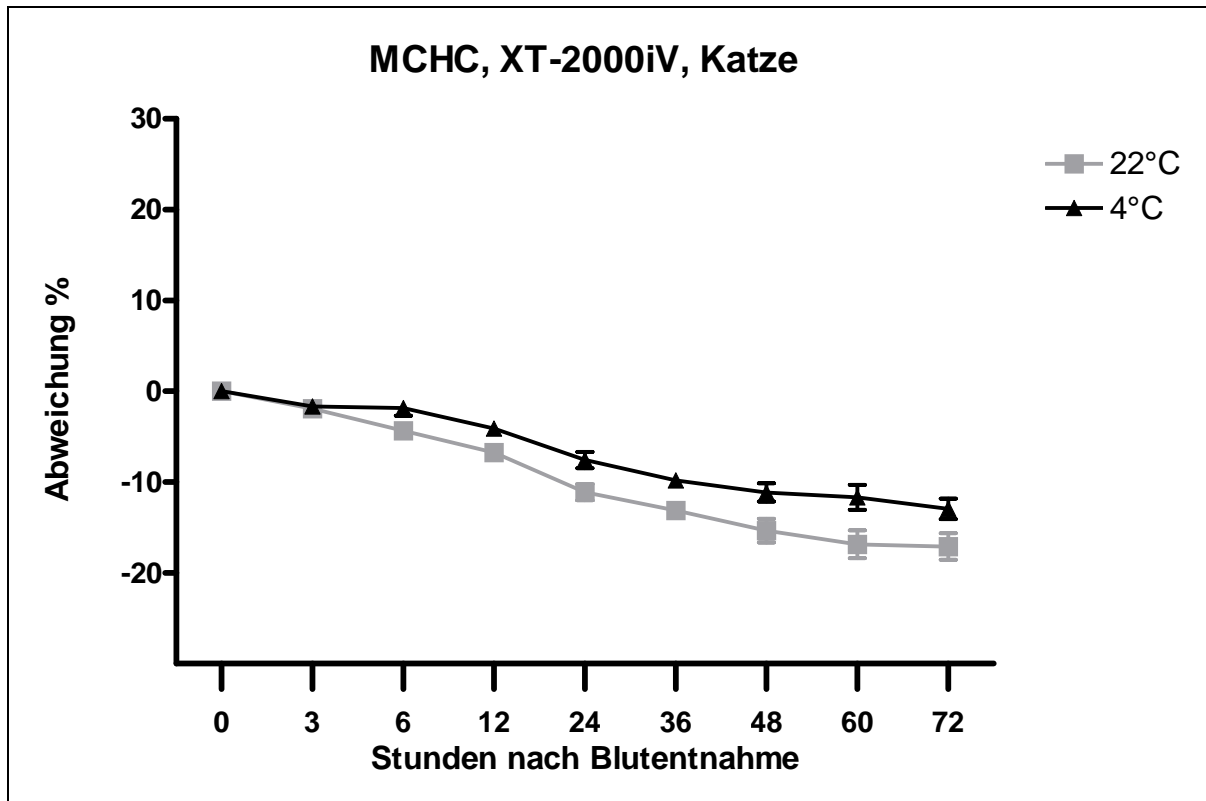


Abbildung 4.9: Prozentuale Abweichung des MCHC im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

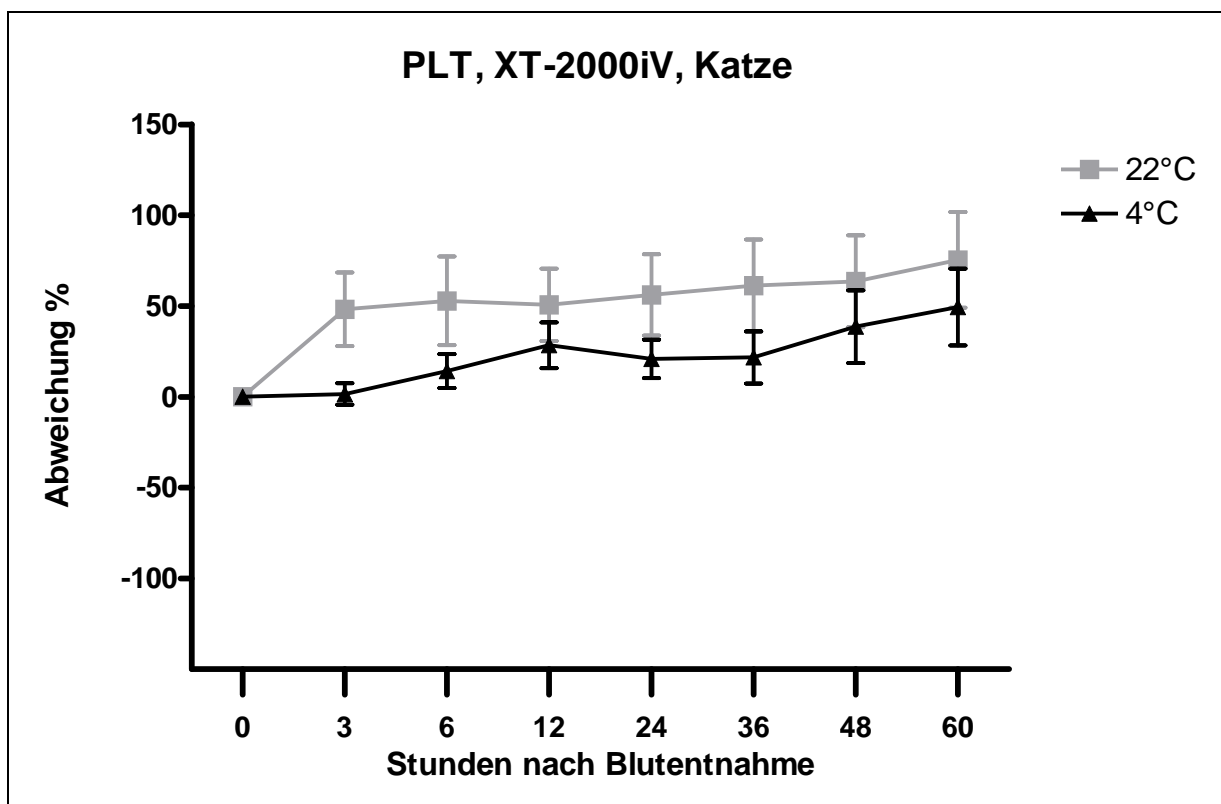


Abbildung 4.10: Prozentuale Abweichung der Thrombozytenzahl im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze



## 4. Ergebnisse

### 4.6.2 Zellzählung pochH-100iV Diff

Lagerungsversuch pochH-100iV Diff			
Parameter	Signifikanz P Lagerungszeit	Signifikanz P Lagerungstemperatur	Signifikanz P Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und –dauer
WBC	--	--	--
RBC	0,046	0,10	0,042
HGB	0,48	0,68	0,25
HCT	0,0002	0,0129	0,0079
MCV	0,0000	0,0004	0,0005
MCH	0,0007	0,053	0,0007
MCHC	0,0000	0,0006	0,0002
PLT	--	--	--

*Tabelle 4.21: Einfluss der Lagerungsdauer und der -temperatur auf die Messergebnisse der Blutzellzählung, pochH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze*

Bei der Gesamtleukozyten- und Thrombozytenmessung konnte auf Grund von zu vielen fehlenden Daten durch Fehlermeldungen keine Signifikanzbestimmung erfolgen. Hieraus schließt sich, dass ein Lagerungsversuch des Differentialblutbildes beim pochH-100iV Diff ebenfalls nicht auswertbar war.

Ein signifikanter Einfluss der Lagerungszeit wird bei den Parametern RBC, HCT, MCV, MCH und MCHC festgestellt.

Bei Betrachtung der Grafiken und der Messungen in Folge fallen folgende Ausreißer auf: 3 Stunden Messungen des HGB sowie 12 Stunden Messungen der Parameter RBC, HCT, MCV, MCH, MCHC. Da anhand der Datenreporte keine Hinweise auf eine Fehlmessung ersichtlich sind, werden die Ausreißer für die Ermittlung der Signifikanzen belassen.

#### 4. Ergebnisse

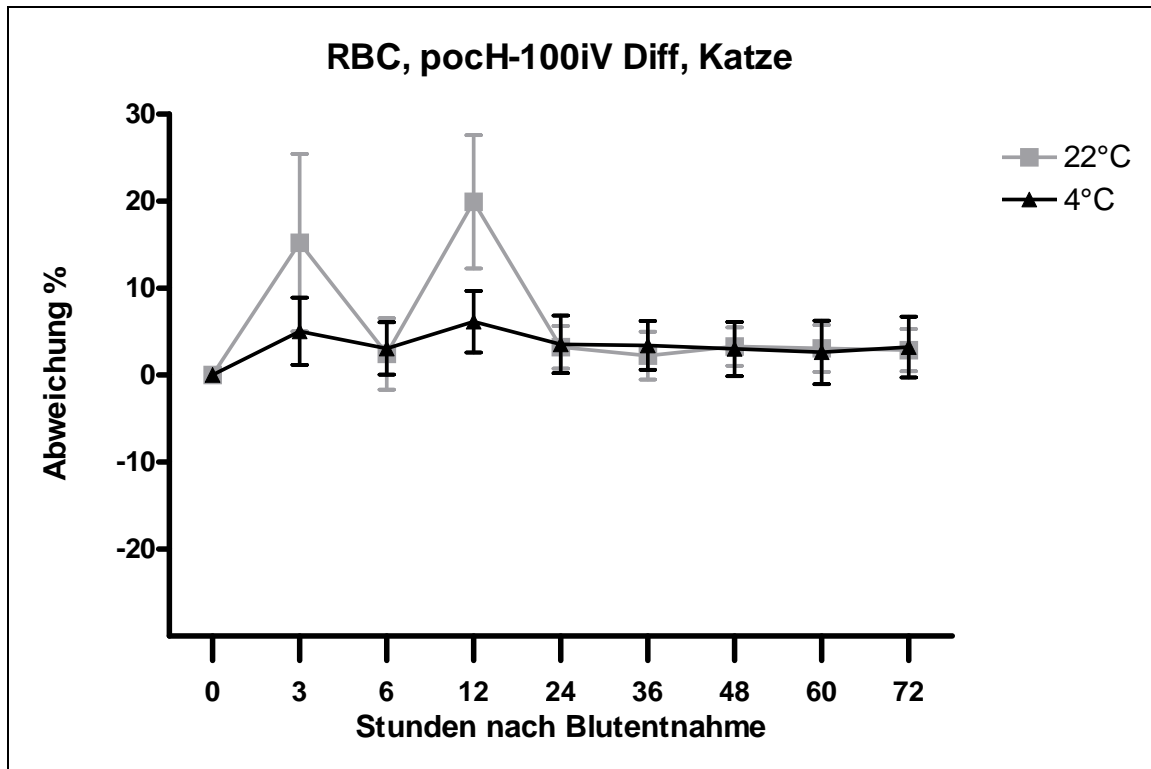


Abbildung 4.11: Prozentuale Abweichung der Erythrozytenzahl im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, pocH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze

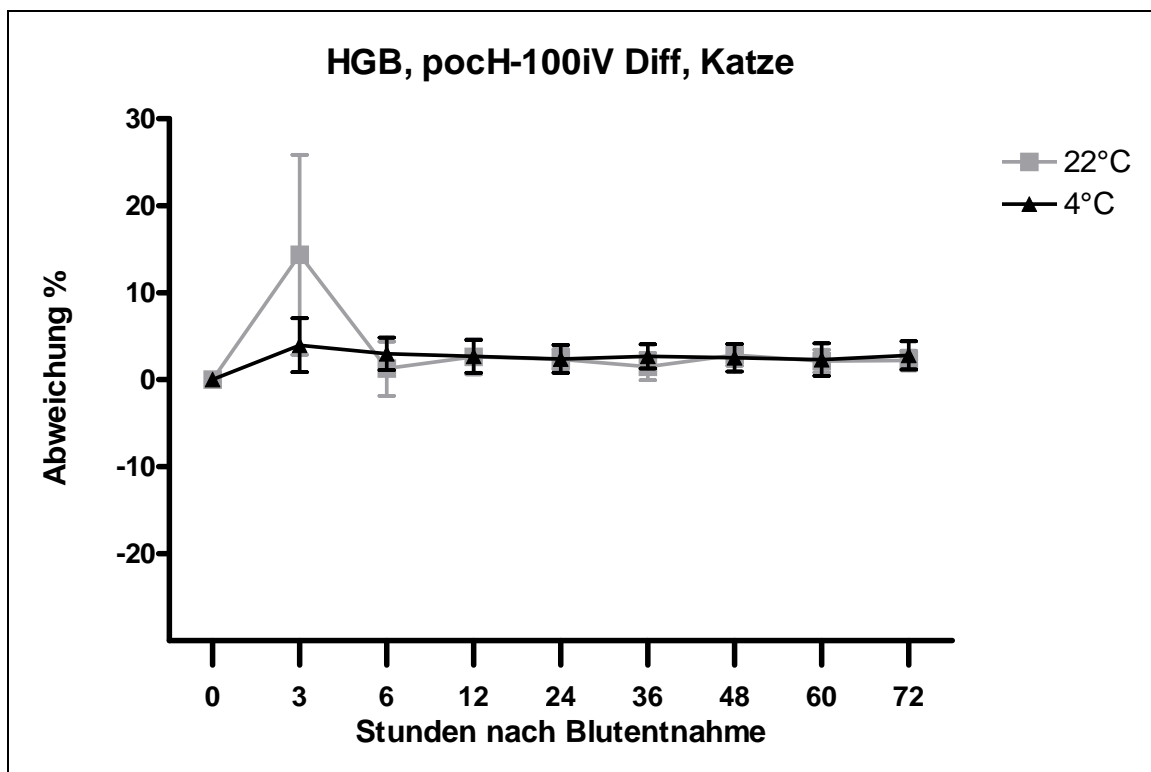


Abbildung 4.12: Prozentuale Abweichung des Hämoglobingehaltes im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, pocH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze

#### 4. Ergebnisse

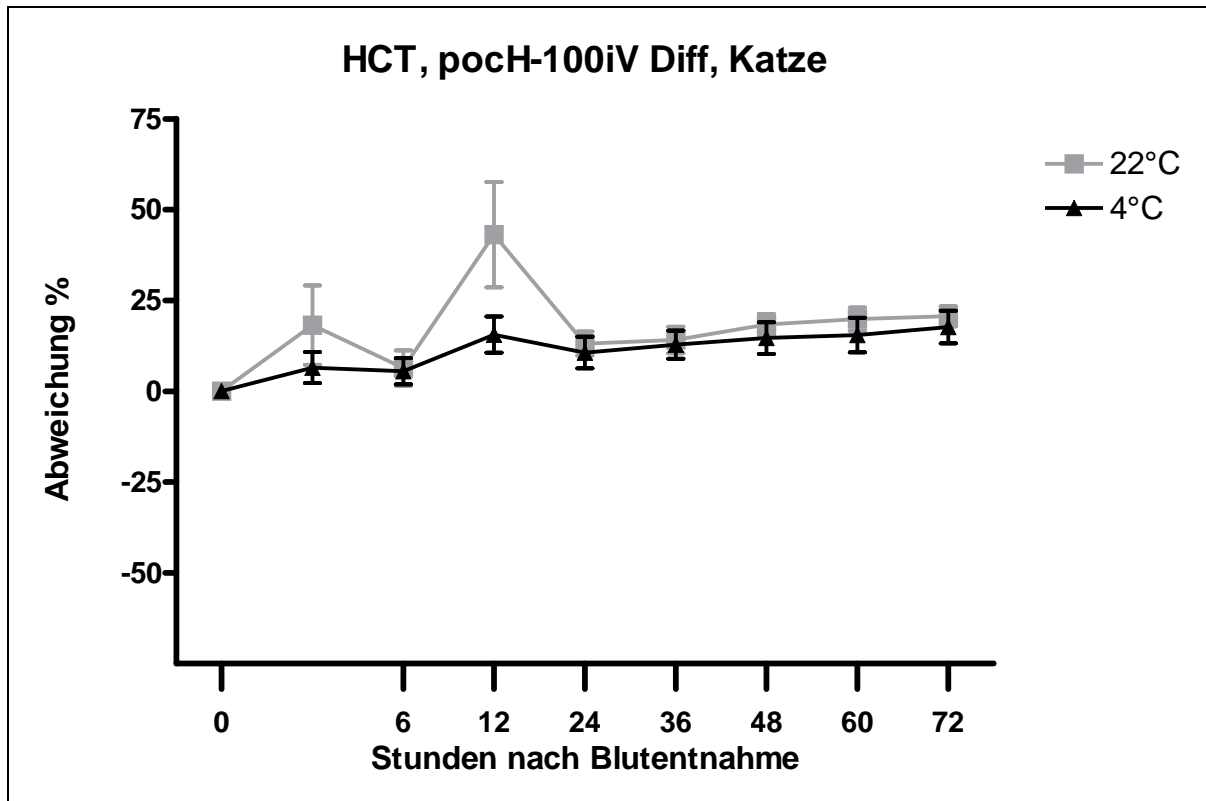


Abbildung 4.13: Prozentuale Abweichung des Hämatokrits im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, pochH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze

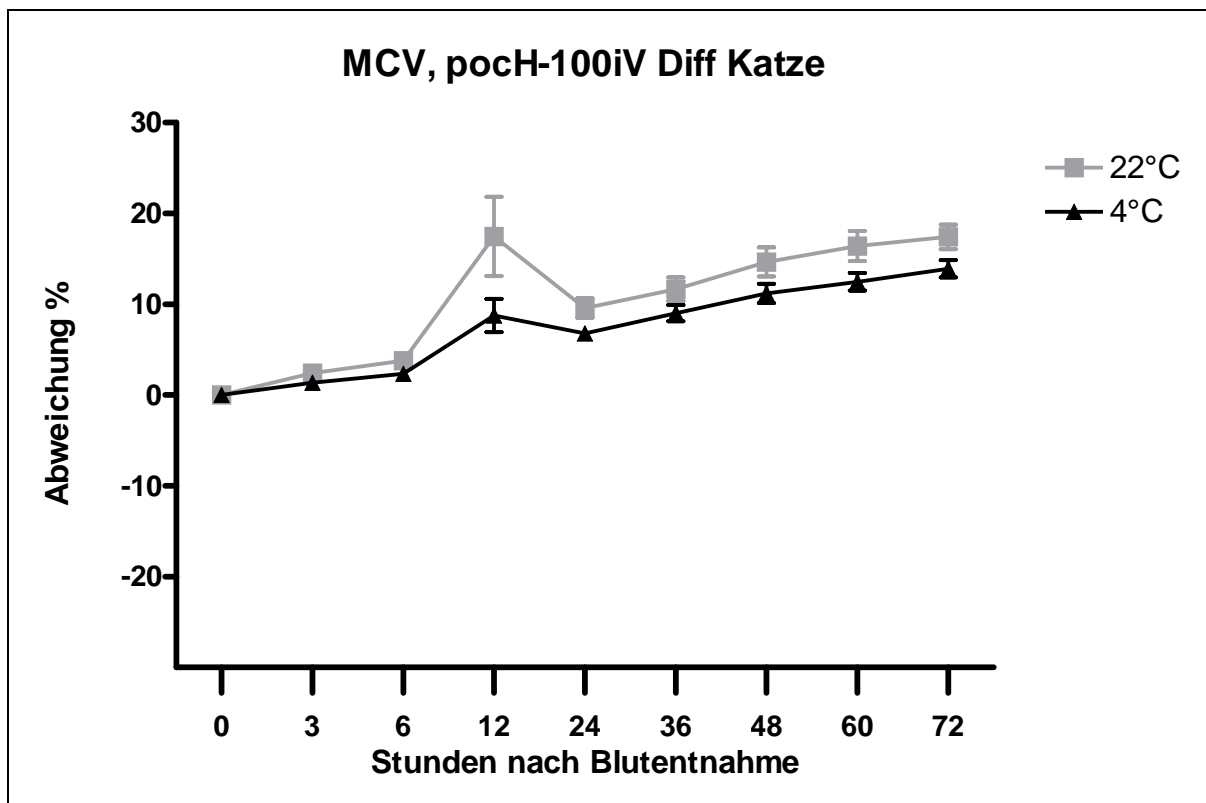


Abbildung 4.14: Prozentuale Abweichung des MCV im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, pochH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze

#### 4. Ergebnisse

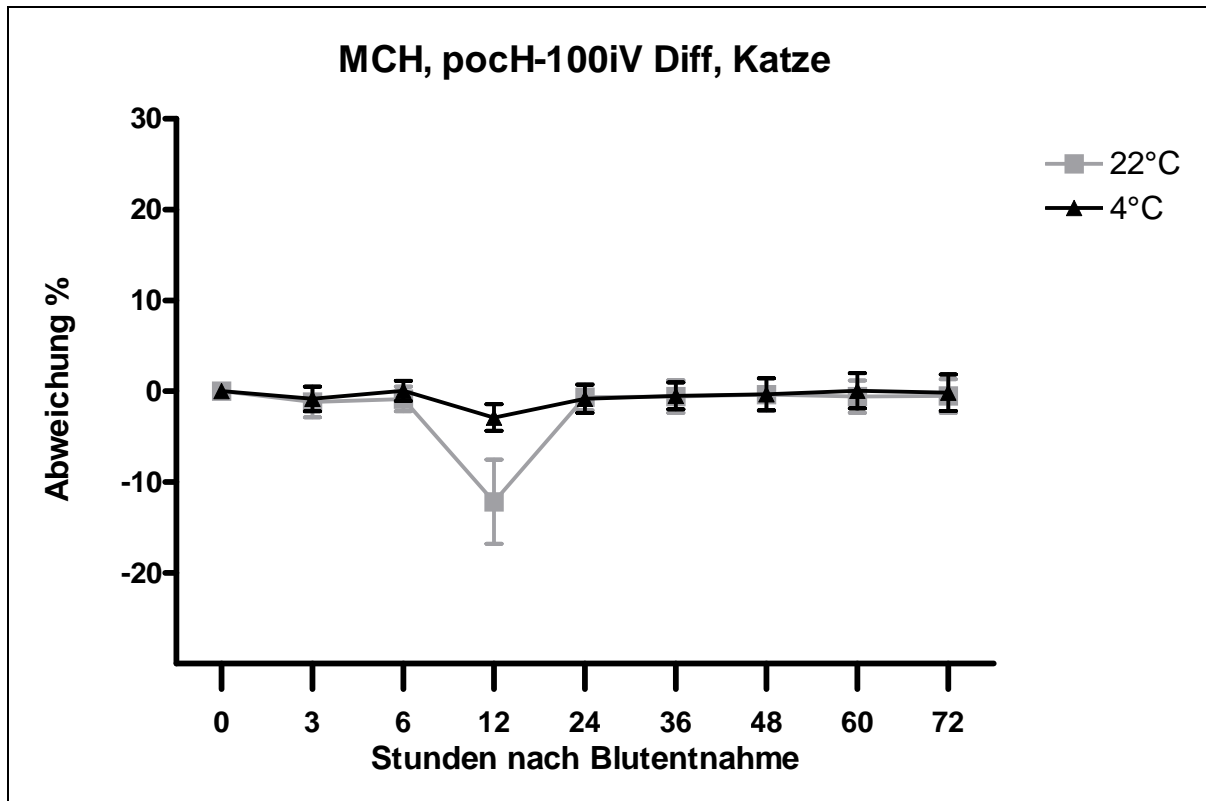


Abbildung 4.15: Prozentuale Abweichung des MCH im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, pochH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze

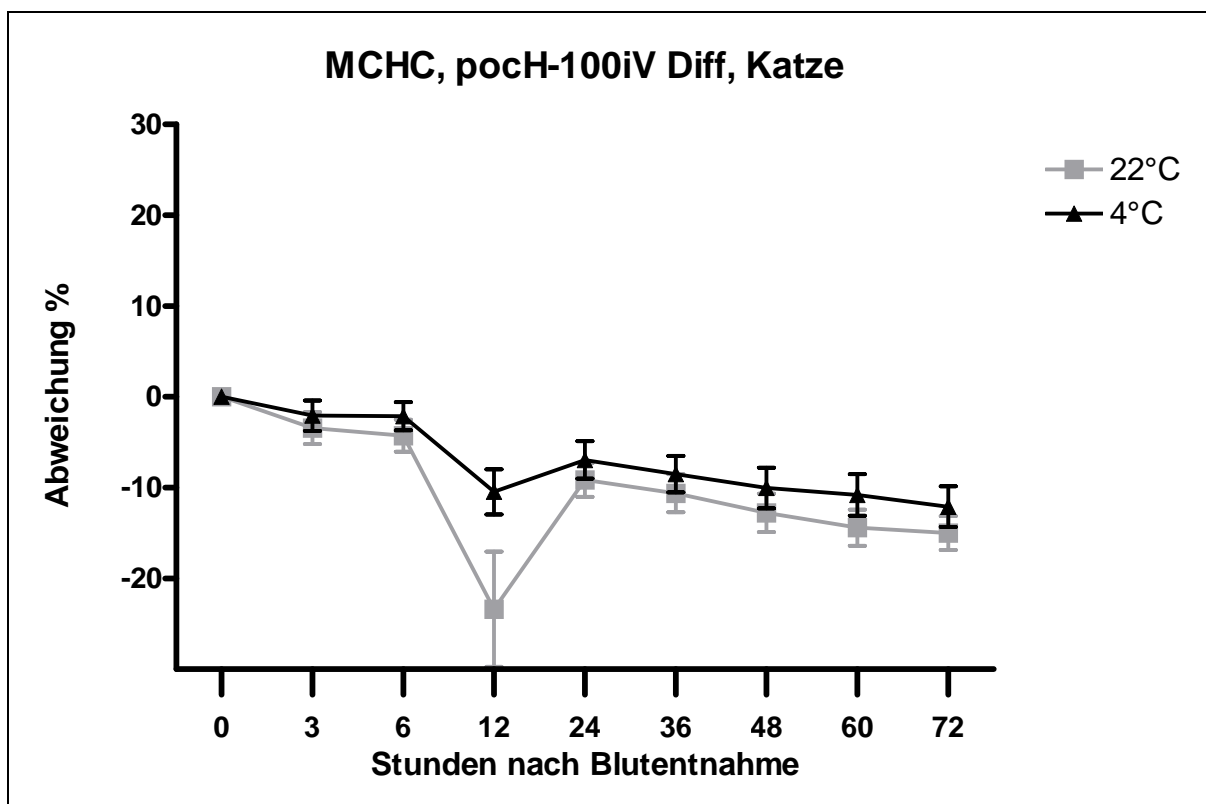


Abbildung 4.16: Prozentuale Abweichung der MCHC im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, pochH-100iV Diff, n=9, Tierart Katze

## 4. Ergebnisse

### 4.6.3 Differentialblutbild XT-2000iV

Lagerungsversuch XT-2000iV			
Parameter	Signifikanz P Lagerungszeit	Signifikanz P Lagerungstemperatur	Signifikanz P Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und -dauer
Neutrophile	0,0000	0,021	0,13
Lymphozyten*	0,0000	0,039	0,025
Monozyten*	0,0000	0,0088	0,0000
Eosinophile*	0,26	0,043	0,0082

*Tabelle 4.22: Einfluss der Lagerungsdauer und der –temperatur auf die Messergebnisse des Differentialblutbildes, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze, \*Werte wegen fehlender Normalverteilung logarithmiert*

Signifikante Unterschiede finden sich bei den Parametern Neutrophile, Lymphozyten und Monozyten des Differentialblutbildes im Hinblick auf die Lagerungszeit. Alle Parameter zeigen Signifikante Unterschiede im Betracht der Temperatur. Die Zählungen der Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten weisen signifikante Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf.

Die Abbildungen 4.17 bis 4.20 sollen die Verläufe veranschaulichen. Auffallend sind dabei vor allem die bei Raumtemperatur gelagerten Proben: Ab dem Zeitpunkt von 12 Stunden steigt die Population der neutrophilen und der eosinophilen Granulozyten an. Im Gegensatz dazu sinken die Lymphozyten und Monozyten ab.

Diese Tendenz kann ab einem Zeitpunkt von 36 Stunden auch bei den kühl gelagerten Proben erkannt werden. Bei den eosinophilen Granulozyten sind die Abweichungen im Vergleich zum Ausgangswert nur marginal, bei den anderen Parametern des Differentialblutbildes sind sie deutlich geringer als bei den Messungen der bei Raumtemperatur gelagerten Proben.



#### 4. Ergebnisse

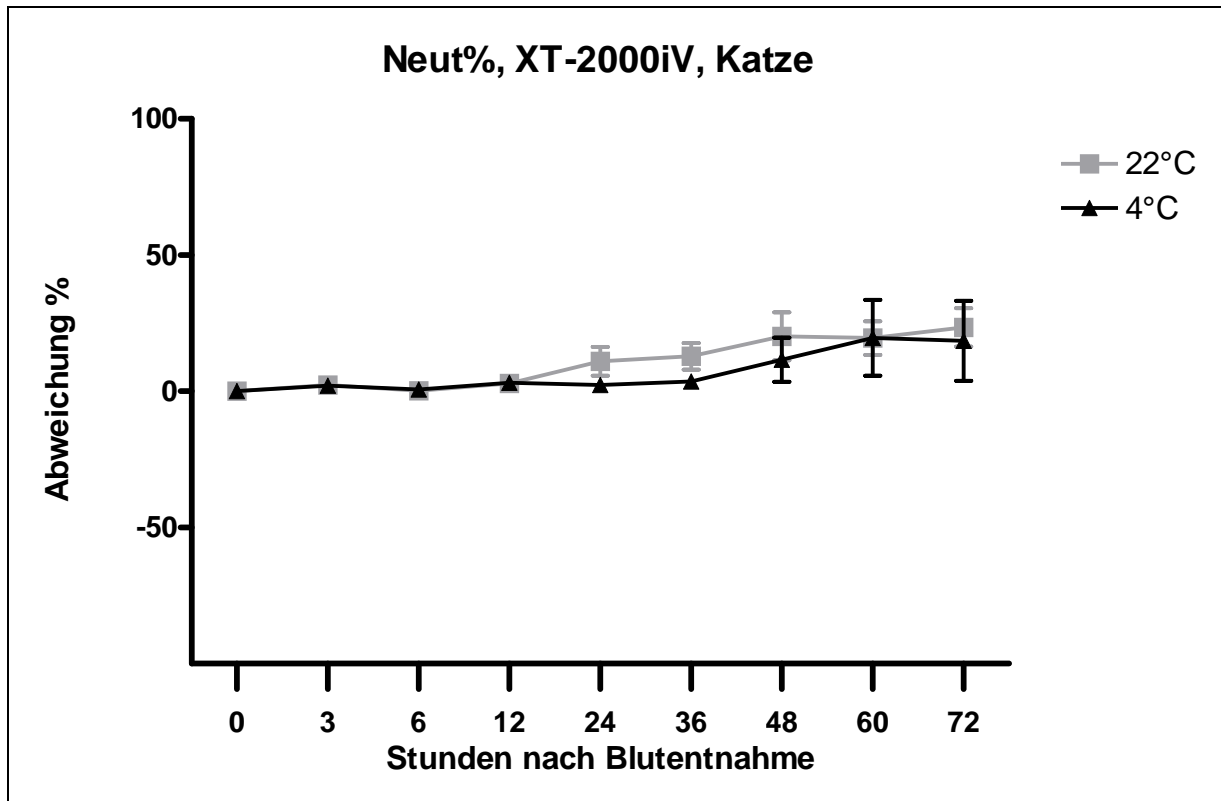


Abbildung 4.17: Prozentuale Abweichung der neutrophilen Granulozyten im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

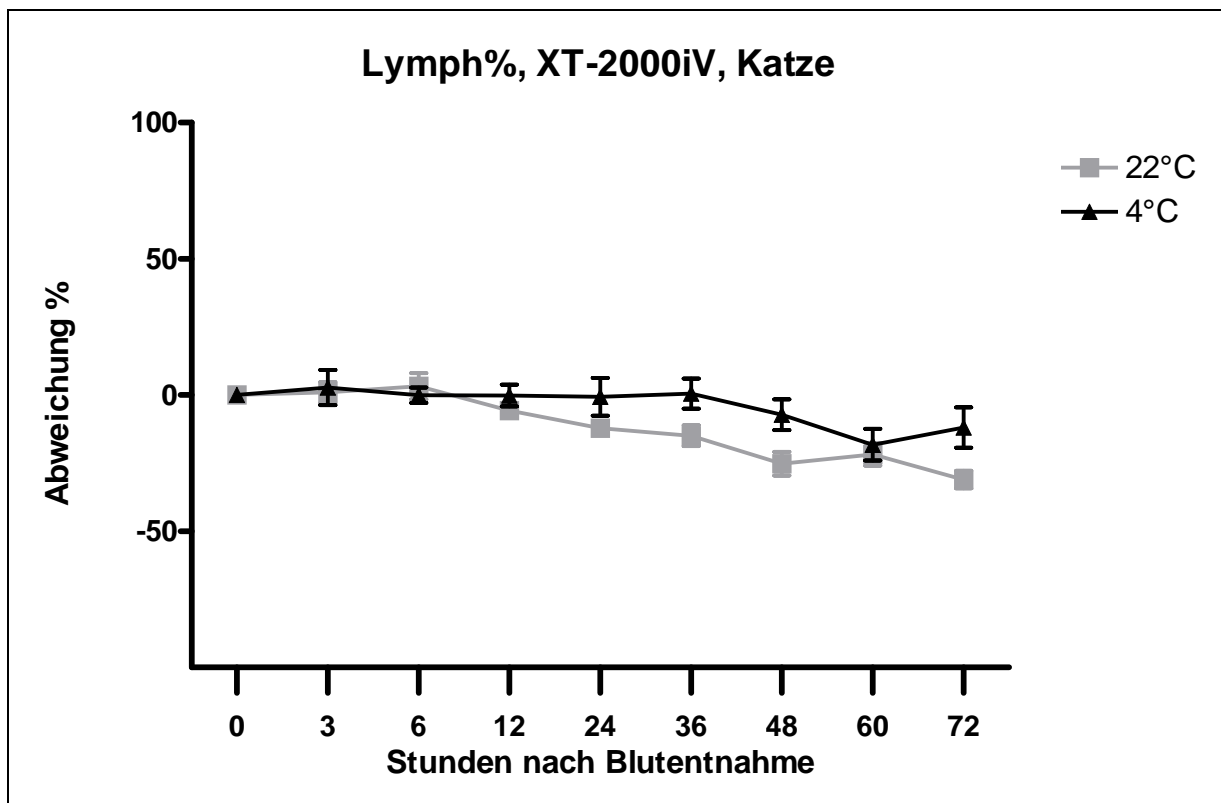


Abbildung 4.18: Prozentuale Abweichung der Lymphozyten im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

#### 4. Ergebnisse

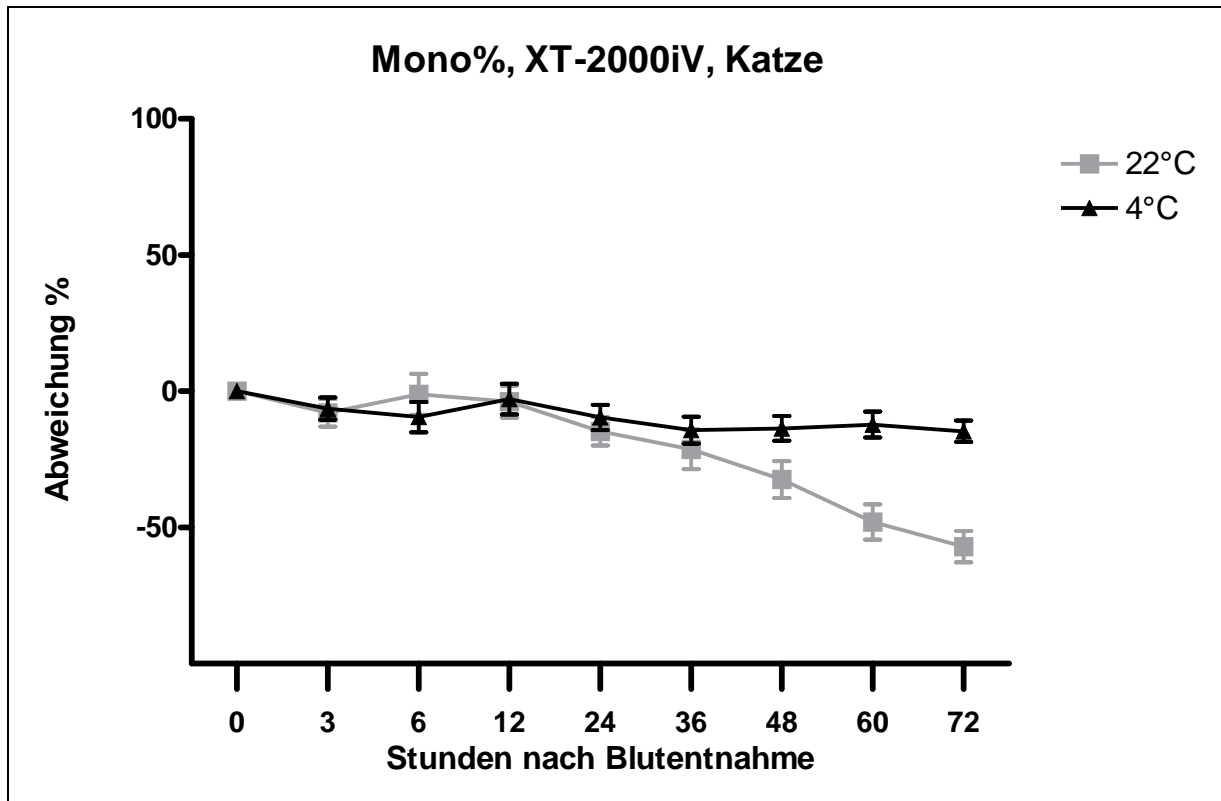


Abbildung 4.19: Prozentuale Abweichung der Monozyten im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

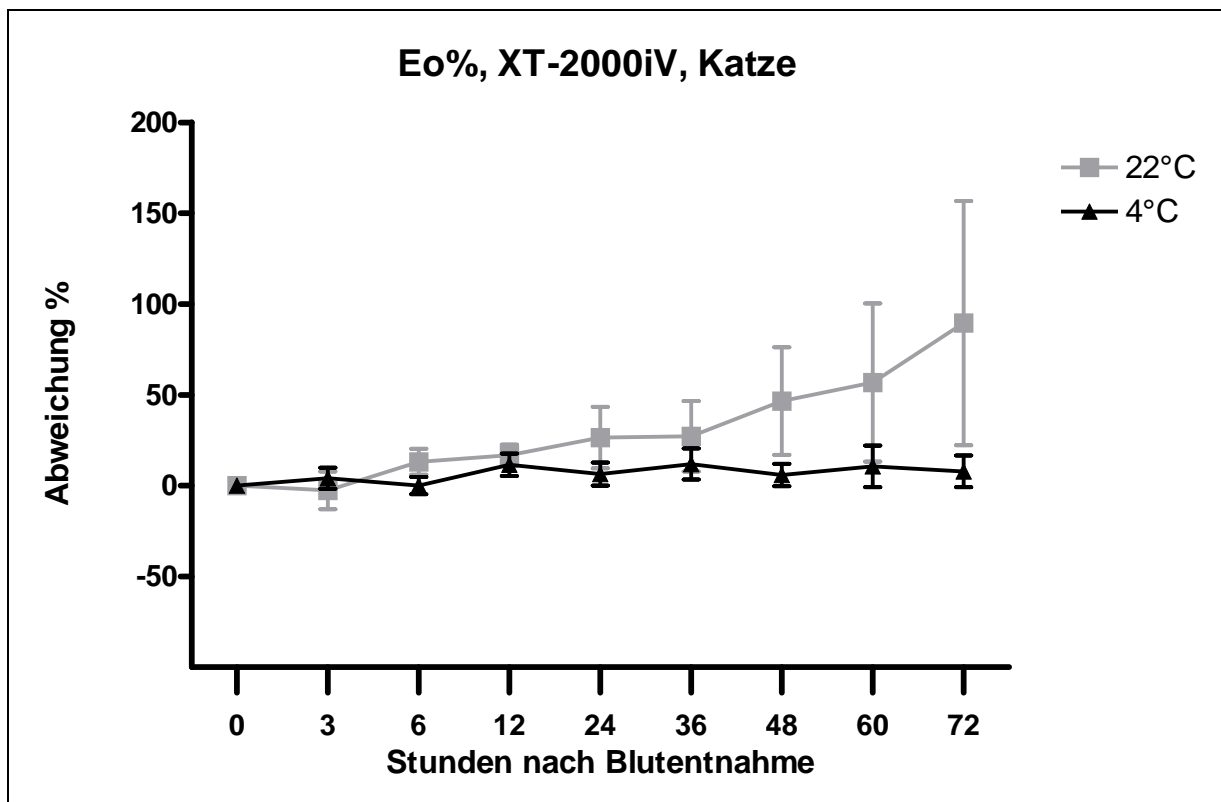


Abbildung 4.20: Prozentuale Abweichung der eosinophilen Granulozyten im Verlauf von 72 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

## 4. Ergebnisse

### 4.6.4 Retikulozyten im XT-2000iV

Lagerungsversuch XT-2000iV			
Parameter	Signifikanz P Lagerungszeit	Signifikanz P Lagerungstemperatur	Signifikanz P Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und -dauer
Retikulozyten**	0,0000	0,0015	0,91

*Tabelle 4.23: Einfluss der Lagerungsdauer und der –temperatur auf die Messergebnisse des Differentialblutbildes, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze*

*\*\* auf Grund fehlender Daten für einen 72h-Wert wird ein Wald-Test durchgeführt.*

Betrachtet man den Lagerungsversuch der Retikulozyten, fallen signifikante Unterschiede in der Lagerungszeit und –Temperatur auf. Die Wechselwirkung zwischen Lagerungstemperatur und -dauer ist nicht signifikant. In der Abbildung 4.21 kann man erkennen, dass die kühl gelagerten Proben deutlich konstanter bleiben. Tendenziell ist ein Anstieg der Retikulozytenzahl im Verlauf der Messungen zu beobachten.

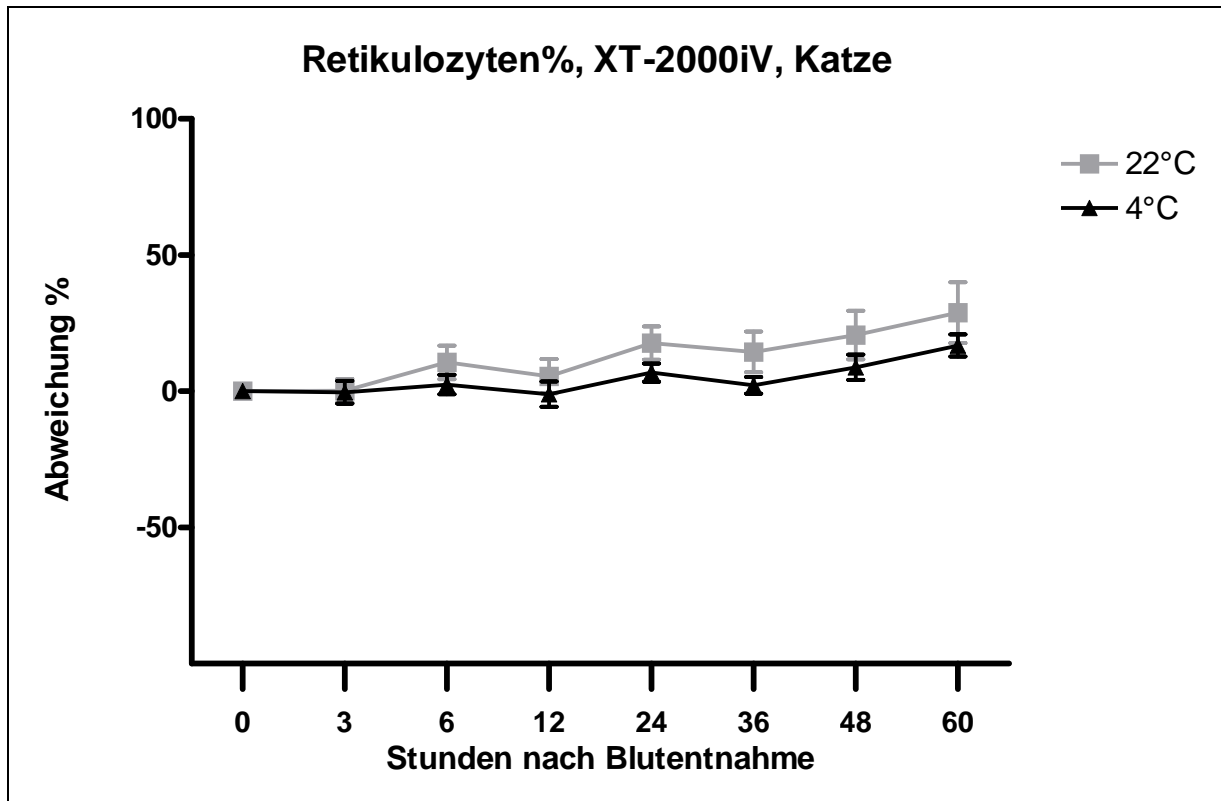


Abbildung 4.21: Prozentuale Abweichung der Retikulozyten im Verlauf von 60 Stunden nach der Blutentnahme bei 22°C und 4°C, XT-2000iV, n=9, Tierart Katze

### 5 Diskussion

Die automatischen Hämatologiesysteme Sysmex pocH-100i und XT-2000i wurden bereits für die Humanmedizin evaluiert (Briggs et al., 2003; Fernandes und Hamaguchi, 2003; Langford et al., 2003).

Für den veterinärmedizinischen Gebrauch wird eine Softwareadaptation vorgenommen, die speziesspezifische Unterschiede berücksichtigen soll. Die speziell für die Tiermedizin auch namentlich gekennzeichneten Geräte pocH-100iV Diff und XT-2000iV werden in dieser Studie hinsichtlich der Genauigkeit und Übereinstimmung mit einem anderen bereits evaluierten System, dem ADVIA 2120, überprüft. Auch für den Anwender wichtige Faktoren wie Messgeschwindigkeit, Kosten und Benutzerfreundlichkeit spielen bei der Beurteilung eine Rolle.

#### 5.1 Präzision, Linearität und Verschleppung

Die Präzision ist entscheidend für die Reproduzierbarkeit der gemessenen Proben. Sie stellt den Zufallsfehler eines Gerätes dar. Bevor man einen Methodenvergleich zwischen zwei Hämatologiesystemen durchführt, sollte stets eine Präzision ermittelt werden (Jensen und Kjølgaard-Hansen, 2006; Westgard, 2003).

In anderen vorangegangenen Studien zur Evaluation von Hämatologiesystemen wird ein Variationskoeffizient von unter 3% als exzellent bezeichnet (Meyer, 2005; Neuerer, 2005).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind vergleichbar mit anderen durchgeführten Präzisionsstudien (Meyer, 2005; Moritz, 2000; Neuerer, 2005).

Aus den Tabellen 4.1 bis 4.3 geht hervor, dass die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH und MCHC Variationskoeffizienten zwischen 0,31% und 3,71% und somit sehr gute bis exzellente Ergebnisse aufweisen. Der Variationskoeffizient der PLT liegt beim ADVIA 2120 bei 6,9%. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Variationskoeffizienten für den ADVIA 120 in der Studie von Meyer (Meyer, 2005). In dieser wird ein Variationskoeffizient von 8,4% errechnet.

## 6. Zusammenfassung

---

Der XT-2000iV bietet einen ebenfalls vergleichbaren Variationskoeffizienten der PLT von 7,26%. Auffallend ist der hohe Variationskoeffizient der Thrombozyten beim pocH-100iV Diff mit 118,62%. Der Variationskoeffizient wird hier nicht lediglich durch einen hohen oder tiefen Ausreißer beeinflusst sondern durch mehrfache Abweichungen der Messergebnisse. Die Differenz beim pocH-100iV Diff kann mit der Impedanztechnologie erklärt werden. Da die Katze sowohl zu Thrombozytenagglutinen als auch zu Riesenthrombozyten neigt, können diese ab einer gewissen Größe nicht mehr als Thrombozyten identifiziert werden. Stattdessen ist eine Zuordnung großer Thrombozyten zu Erythrozyten oder agglutinierter Thrombozyten zu größeren Zellen, wie beispielsweise den Leukozyten möglich. Als Resultat ist eine falsche Thrombozytopenie oder eine falsche Leukozytose denkbar (Moritz und Hoffmann, 1997). Thrombozytenagglutinate können jedoch auch Leukozyten „wegfangen“ und somit eine falsche Leukopenie verursachen (Tvedten, 1993).

Die Ergebnisse der Zellzählung sind bis auf die Thrombozytenzahl und die Leukozytenzahl (pocH-100iV Diff) alle unterhalb eines Variationskoeffizienten von 3%.

Der pocH-100iV Diff hat auf den Messergebnissen allerdings stets die Thrombozyten- und Leukozytenzahl mit Fehlermeldungen (AG\*, PU\*) markiert und somit als zweifelhaft beurteilt.

Die Ergebnisse der prozentualen und absoluten Zellzahlen der jeweiligen Geräte sind vergleichbar.

Betrachtet man die Variationskoeffizienten des Differentialblutbildes des pocH-100iV Diff, besteht die größte Differenz bei den eosinophilen Granulozyten (CV 13%). Vergleichbare Variationskoeffizienten finden sich beim ADVIA 120 und beim ADVIA 2120. In der Studie von Meyer liegt der Variationskoeffizient der eosinophilen Granulozyten des ADVIA 120 bei 23,3% (Meyer, 2005). Der ADVIA 2120 weist in dieser Studie für die eosinophilen Granulozyten einen Variationskoeffizienten von 21 % auf. Die eosinophilen Granulozyten der Katze sind peroxidasenegativ und können somit nicht eindeutig im Peroxidasekanal erfasst werden. Die Messung erfolgt im Retikulozytenkanal mit einer Anfärbung mit Oxazin 750 (Meyer, 2005). Der höhere Variationskoeffizient im Vergleich zum pocH-100iV Diff und XT-2000iV könnte sich auf Grund des Methodenunterschiedes erklären.

## 6. Zusammenfassung

---

Der XT-2000iV weist eine sehr gute bis gute Präzision mit Variationskoeffizienten zwischen 1,18% und 7,81% auf. Die Präzision des XT-2000iV für die neutrophilen Granulozyten (1,18 %) und die Lymphozyten (2,65%) ist als hervorragend hervorzuheben.

Bezüglich der Präzisionsmessung der Retikulozytenzählung werden mit der Literatur vergleichbare Werte erreicht. Meyer erzielt eine Präzision der absoluten Retikulozytenzahl von 9% (Meyer, 2005),

Der Verschleppungsversuch (carry-over) liefert eine wichtige Information darüber, ob die vorangegangene Probe die darauf folgende hinsichtlich ihrer Zellzählung beeinflusst und zu falsch hohen Zählungen führt. Dieser Versuch wird für die Parameter WBC, RBC, HGB und PLT der Geräte XT-2000iV und pocH-100iV Diff durchgeführt. Hierfür sind die Ergebnisse jeweils im Rahmen des geforderten Bereichs  $\leq 0,25\%$  (Bollinger et al., 1987).

Wie die Studie von Meyer zeigt, ist für den ADVIA 120 keine Verschleppung für die Parameter RBC und HB vorhanden. Auf Grund der zu großen erforderlichen Probenmenge wurde dieser Versuch für WBC und PLT nicht durchgeführt (Meyer, 2005).

Die Linearität für die Parameter RBC und HGB ist über den geforderten Messbereich stabil. Jedoch ist auf Grund der geringen Probenmenge, die für den Versuch zu Verfügung stand, bei der Gesamtleukozytenzahl lediglich eine Linearität bis  $44 \times 10^9/l$  nachweisbar. Eine Anreicherung der Thrombozyten ist auf Grund der geringen Probenmenge nicht möglich. Auf Grund dessen wird die Linearität der Thrombozyten nicht bestimmt. In einer Studie aus der Humanmedizin wird beim XT-2000i eine gute Linearität der Leukozyten bis  $410 \times 10^9/l$  nachgewiesen. Dafür wurde eine Blutprobe eines Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie verwendet (Langford et al., 2003).

### 5.2 Methodenvergleich

Die Beurteilung der Richtigkeit und des systematischen Fehlers einer Methode erfolgt im Methodenvergleich. Für den Gebrauch in der Praxis sind systematische Unterschiede bei einem für eine medizinische Entscheidung kritischen Punkt von besonderer Bedeutung. Außerdem ist die Beschreibung von konstanten und proportionalen Fehlern für eine Geräteevaluierung wichtig (Westgard, 2003).

Im „international council for standardization for hematology“ wird der Methodenvergleich als Übereinstimmung des erwarteten, gemessenen Wertes und des wahren Wertes beschrieben (ICSH, 1994). In dieser Studie erfolgt der Methodenvergleich zwischen einem bereits evaluierten, in der Veterinärmedizin akzeptierten Hämatologiesystem, dem ADVIA 2120 und einem weiteren Gerät für große Laboratorien, dem XT-2000iV beziehungsweise dem pochH-100iV Diff, einem Hämatologiesystem für die tierärztliche Praxis.

Ein hoher Korrelationskoeffizient spiegelt lediglich einen linearen Zusammenhang zwischen zwei Methoden wieder und garantiert nicht eine gute Übereinstimmung zweier Werte. Systematische Fehler werden durch den Korrelationskoeffizienten nicht dargestellt (Jensen und Kjølgaard-Hansen, 2006; Petrie und Watson, 2006; Westgard, 2003).

Dies soll anhand eines Beispiels aus den eigenen Ergebnissen verdeutlicht werden:



## 6. Zusammenfassung

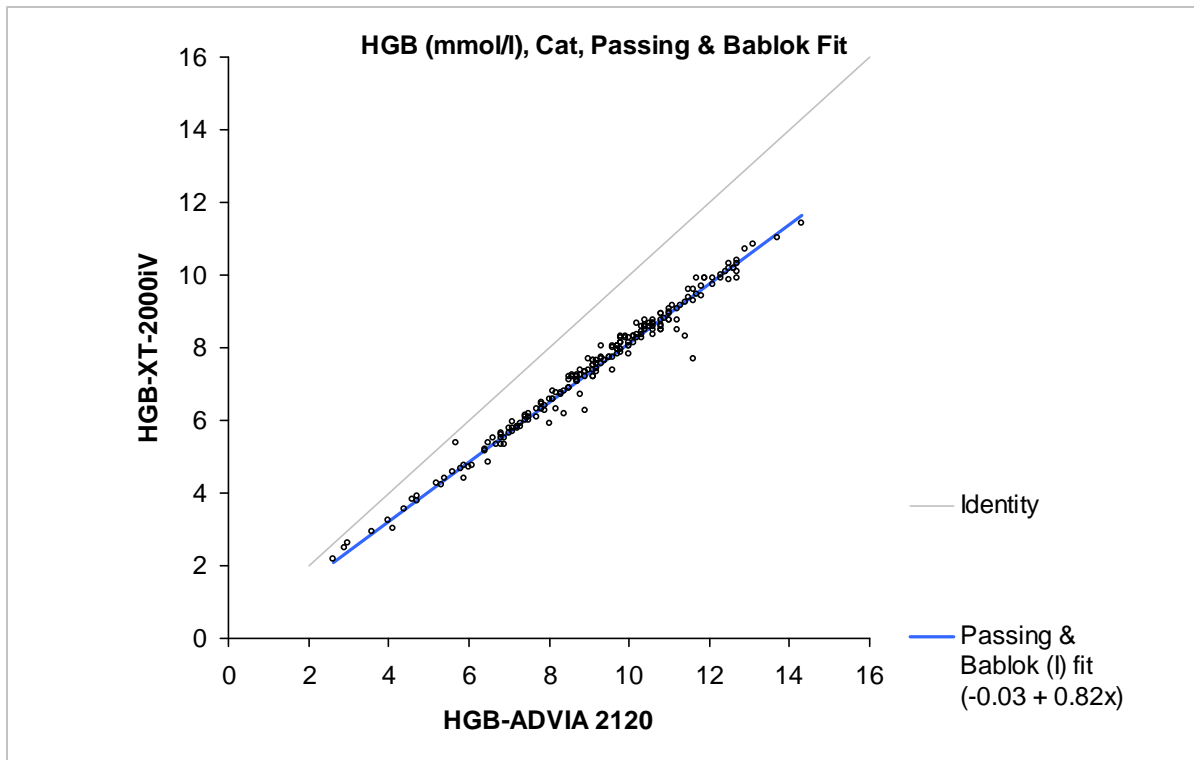


Abbildung 5.1 Passing und Bablok Regression, X-Achse: Hämoglobinmessung des ADVIA 2120, Y-Achse: Hämoglobinmessung des XT 2000iV, Tierart Katze.  $r = 0,99$  (übernommen aus linearer Regression)

## 6. Zusammenfassung

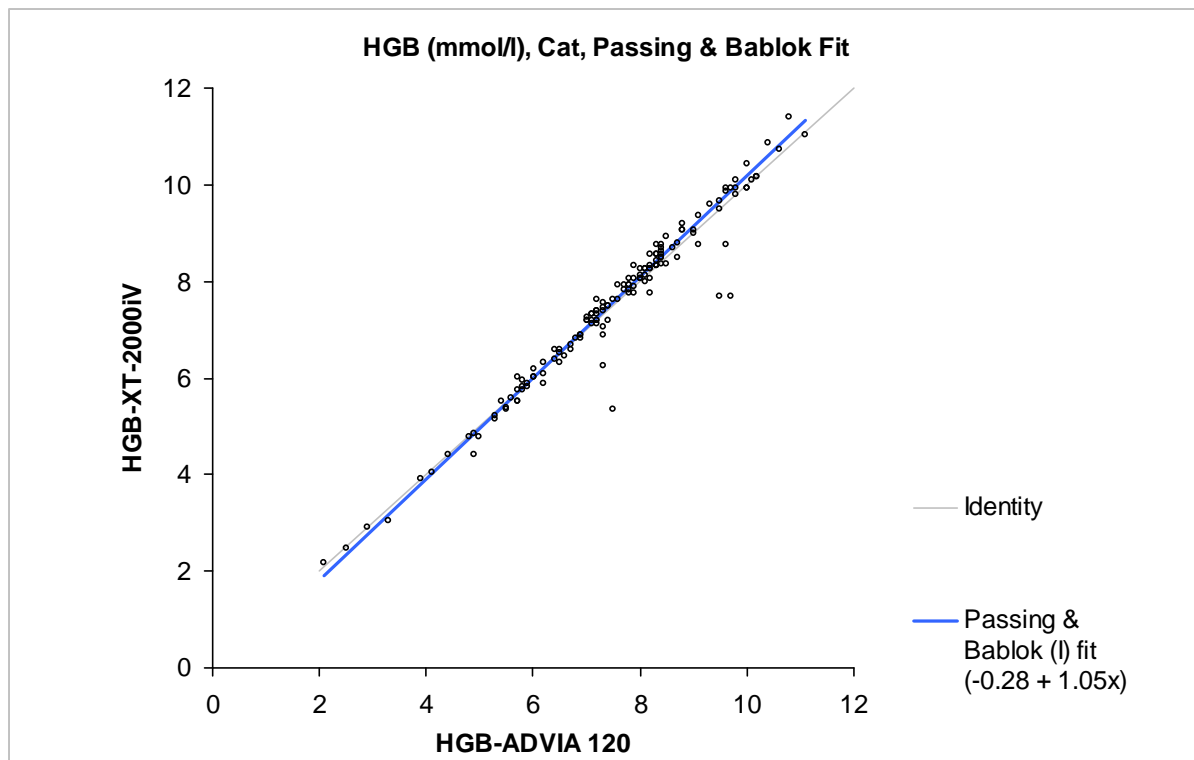


Abbildung 5.2 Passing und Bablok Regression, X-Achse: Hämoglobinmessung des ADVIA 120, Y-Achse: Hämoglobinmessung des XT 2000iV, Tierart Katze.  $r = 0,98$  (übernommen aus linearer Regression)

Vergleicht man die Korrelationskoeffizienten der Messungen aus Abb. 5.1 und Abb. 5.2, sind diese mit 0,98 und 0,99 im exzellenten Bereich. Im Methodenvergleich der Hämoglobinmessung zwischen ADVIA 2120 und XT-2000iV fällt anhand der graphischen Darstellung jedoch ein proportionaler Fehler auf. Bei Betrachtung der Gleichung  $y = ax + b$  wird die unterschiedliche Steigung (der slope-Wert  $< 1$ ) und somit der proportionale Fehler deutlich. Derselbe proportionale Fehler wurde bei einer Vergleichsmessung zwischen ADVIA 120 (cyanhaltige Hämoglobinmessung) und ADVIA 2120 (cyanfreie Hämoglobinmessung) bei den Tierarten Hund, Katze und Pferd gefunden. In der Softwareversion für Humanblut scheint keine Divergenz vorzuliegen (Bauer und Moritz, 2008). Die Angaben lassen erkennen, dass die Hämoglobinmessung des ADVIA 2120 falsch hohe Werte ergibt und somit der ADVIA 2120 an den ADVIA 120 adaptiert werden sollte.

Je niedriger der Korrelationskoeffizient, desto mehr streuen die Daten. Eine Korrelation von 1 bedeutet einen optimalen linearen Zusammenhang zwischen zwei

Methoden. Bei einem Korrelationskoeffizienten  $< 0,975$  ist die Datenstreuung bereits so groß, dass eine einfache lineare Regressionsanalyse nicht mehr ausreicht.

Die CLIA hat für den „total error“, dem Gesamtfehler einer Messmethode, der sich aus dem systematischen und dem zufälligen Fehler zusammensetzt, Grenzwerte festgelegt. Bei der Beurteilung des „total errors“ kommt es hauptsächlich auf Werte an, die für eine medizinische Entscheidung wichtig sind, das heißt beispielsweise pathologisch erniedrigte oder erhöhte Zellzahlen. Manche Autoren empfehlen die Berechnung des Gesamtfehlers von niedrigen, mittleren und hohen Werten für medizinische Entscheidungspunkte (Ferreira und Freeman, 2009). Für die jeweiligen medizinischen Entscheidungspunkte sollten Wiederholungsexperimente zum Erhalt der Standardabweichung erfolgen. Da in dieser Studie lediglich ein gesundes Tier mit normalen Laborparametern für das Wiederholungsexperiment hinzugezogen wurde, stellt dies ein limitierender Faktor dar, der in folgenden Studien berücksichtigt werden sollte.

Alternativ werden, um die Akzeptanz einer Messmethode beurteilen zu können, die Werte intercept, slope (aus linearer, Deming Regression oder Passing Bablok Regression) und bias (aus Bland-Altman Analyse) hinzugezogen (Koch und Peters, 2001; Westgard, 2003).

### 5.3 Zellzählung

Betrachtet man nun die eigenen Untersuchungen, kann für die Gesamtleukozytenzahl ein exzellentes Resultat erzielt werden.

Zum direkten Vergleich werden Ergebnisse aus verschiedenen Studien herausgegriffen. In der Studie von Becker werden sieben verschiedene Hämatologiesysteme mit dem ADVIA 120 verglichen (Becker, 2007). In den folgenden Tabellen (5.1 bis 5.6) werden die Ergebnisse eines auf Laser basierenden (LaserCyte, IDEXX) und eines auf der Impedanzmethode (Vet ABC, Scil) basierenden Gerätes aufgeführt. In der Studie von Meyer wird der ADVIA 120 seinem Vorgängermodell Technicon H\*1 gegenübergestellt (Meyer, 2005). Als drittes wird die Studie von Neuerer dargestellt. Sie beruht auf dem Vergleich des CELL-DYN 3500 mit manuellen Methoden.

## 6. Zusammenfassung

Im Hinblick auf den Korrelationskoeffizienten der Gesamtleukozytenzahl haben die Studien vergleichbare Werte ergeben.

Der pocH-100iV Diff hat mit seiner Impedanztechnologie stets gute Ergebnisse erzielt. Jedoch ist bei 15 von 150 Proben keine Gesamtleukozytenzahl gemessen worden. Diese wurden mit „\*000“ gekennzeichnet und sind mit einer unzuverlässigen Messung meist auf Grund von Thrombozytenaggregaten verbunden. Die gehäufte Bildung von Thrombozytenaggregaten bei der Tierart Katze stellt vor allem für die Impedanzmethode ein technisches Problem dar (Tvedten, 1993). Eine solche Fehlermeldung muss durch einen manuellen Blutaussstrich verifiziert werden.

<b>WBC, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,95	0,10	1,02	0,71
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,99	0,07	1,01	0,18
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,979	-1,20	1,10	0,22
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,986	-0,14	1,01	-0,15
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,995	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	0,977	0,323	0,982	--

*Tabelle 5.1: Ergebnisvergleich der Leukozytenzählung der eigenen Studie mit drei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1</sup> ADVIA 2120, <sup>2</sup> ADVIA 120, <sup>3</sup> Technicon H\*1, <sup>4</sup> manuell*

Die Erythrozytenzahl wird sowohl beim XT-2000iV als auch beim pocH-100iV Diff in den steigenden Messbereichen im Vergleich zum ADVIA 2120 höher gemessen. Ein ähnlicher proportionaler Fehler liegt auch in der Studie von Becker beim Vet ABC vor (slope von 1,09) (Becker, 2007). Der methodische Unterschied bezüglich der Messung der RBC der Geräte pocH-100iV Diff und XT-2000iV im Vergleich zum ADVIA 2120 könnte für diesen Fehler verantwortlich sein. Erstere analysieren mittels Impedanz- letzteres Gerät mittels isovolumetrischer Aufkuglung und Lasertechnologie.

<b>RBC, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	Slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,97	-0,33	1,08	0,30
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,99	-0,37	1,11	0,46
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,983	0,27	1,09	0,85
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,981	0,03	1,00	0,01
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,997	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	0,960	1,007	0,886	--

*Tabelle 5.2: Ergebnisvergleich der Erythrozytenzählung der eigenen Studie mit drei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1</sup> ADVIA 2120, <sup>2</sup> ADVIA 120, <sup>3</sup> Technicon H\*1, <sup>4</sup> manuell*

Wie bereits oben erwähnt ist von einer Überschätzung der Hämoglobinwerte durch den ADVIA 2120 auszugehen.

Zum Vergleich werden die erhobenen Daten des XT-2000iV dem ADVIA 120 gegenübergestellt. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98, einem intercept von -0,28, einem slope von 1,05 und einem bias von 0,01 kann von einer sehr guten Übereinstimmung gesprochen werden (Abb. 5.2). Die Zyanid-frei gemessenen Hämoglobinwerte der Geräte XT-2000iV und pocH-100iV Diff stimmen mit der Zyanidmethämoglobinmethode des ADVIA 120 sehr gut überein.

<b>HGB, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,97	0,35	0,77	-1,81
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,99	-0,03	0,82	-1,72
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,987	-0,53	1,05	0,07
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,983	0,16	0,99	0,10
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,994	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	0,957	0,042	1,062	--

*Tabelle 5.3: Ergebnisvergleich der Hämoglobinemessung der eigenen Studie mit drei weiteren Studien, Tierart Katze.*

*Vergleichsmethode: <sup>1</sup> ADVIA 2120, <sup>2</sup> ADVIA 120, <sup>3</sup> Technicon H\*1, <sup>4</sup> manuell*

In der Hämatokritbestimmung fällt beim XT-2000iV ein deutlicher proportionaler Fehler auf (slope 1,12). Der ADVIA 2120 errechnet sich den Hämatokrit aus der Gesamterthrozytenzahl und dem MCV, welche wiederum mittels Lasertechnik gemessen werden. Der XT-2000iV kalkuliert den Hämatokrit aus der Summe der Einzelimpulse der Erythrozyten mittels Impedanzmethode (Cumulative Pulse Height method). Es handelt sich hierbei um eine Absolutzählung, bei der ein definiertes Volumen der vorverdünnten Blutprobe in die RBC/PLT Detektorlinie gebracht und gemessen wird. Die Zellkonzentration wird somit anhand des Probenvolumens und der definierten Verdünnung ohne die Notwendigkeit einer Gerätekalibration bestimmt. Der XT-2000iV bietet zusätzlich die Möglichkeit, Spezies-spezifische Hämatokritkalibrationsfaktoren zu implementieren, die einer möglichen, tierartlich unterschiedlichen Reaktion der Erythrozyten auf den Einfluss von Reagenzien entgegenwirken.

Die unterschiedlichen Messmethoden können für proportionale Fehler verantwortlich sein. Laut Herstellerangaben ist eine Optimierung der Kalibrierung des Hämatokritwertes der Katze in neueren Versionen des XT-2000iV (aktuelle Version 00-10) bereits durchgeführt worden (Sysmex, 2008). In der zeitgleich durchgeführten Vergleichsstudie der Hämatologiesysteme für die Tierart Hund ist bezüglich der Hämatokritmessung kein proportionaler Fehler aufgefallen (Dissertation Cathrin Dunker), so dass die Vermutung bestätigt wird, dass auf Grund von tierartspezifischen Besonderheiten eine Kalibrierung erfolgen muss. Ein

## 6. Zusammenfassung

Methodenvergleich der Hämatokritmessung zwischen XT-2000iV und CELL-DYN 3500 ergibt einen konstanten Fehler bei der Katze (Lilliehook und Tvedten, 2009).

Beim pocH-100iV Diff sind die Hämatokrit-Werte optimal. In den anderen Studien sind die von 0 abweichenden „intercept“-Werte ein Zeichen für einen systematischen Fehler.

<b>HCT, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,96	0,00	1,01	0,00
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,96	-0,03	1,12	0,02
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,969	2,15	1,05	3,82
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,943	1,51	0,98	0,74
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,992	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	0,969	1,160	0,956	--

*Tabelle 5.4: Ergebnisvergleich der Hämatokritmessung der eigenen Studie mit drei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1</sup> ADVIA 2120, <sup>2</sup> ADVIA 120, <sup>3</sup> Technicon H\*1, <sup>4</sup> manuell*

Betrachtet man die Erythrozytenindizes (MCH, MCHC), macht sich auch hier die abweichende Hämoglobinmessung vom ADVIA 2120 bemerkbar. Die niedrigen Korrelationskoeffizienten beim MCHC zeigen, dass eine geringe Datenverteilungsbreite vorliegt. Der Bias befindet sich im negativen Bereich.

Der MCV-Vergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA 2120 weist einen proportionalen Fehler auf, wobei der XT-2000iV höhere Werte misst.

## 6. Zusammenfassung

<b>MCH, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,94	0,00	0,78	-0,25
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,96	0,05	0,72	-0,26
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	--	--	--	--
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	--	--	--	--
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,978	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	--	--	--	--

<b>MCHC, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,41	-7,54	1,03	-6,62
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,42	-6,92	0,98	-7,25
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	--	--	--	--
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	--	--	--	--
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,758	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	--	--	--	--

<b>MCV, Tierart Katze</b>					
Studie	Hämatologiesystem	r	intercept	slope	bias
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,87	-0,20	1,04	1,53
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,87	-9,59	1,29	2,58
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,946	3,44	0,88	-2,31
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,759	2,46	0,93	-1,15
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,975	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	--	--	--	--

*Tabelle 5.5: Ergebnisvergleich der Erythrozytenindizes (MCH, MCHC, MCV) der eigenen Studie mit drei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1</sup> ADVIA 2120, <sup>2</sup> ADVIA 120, <sup>3</sup> Technicon H\*1, <sup>4</sup> manuell*

Die Zählung der Thrombozyten der Katze stellt jede Methode, ob manuell, Impedanz oder Laser vor eine Herausforderung (Briggs et al., 2007). Eine korrekte Thrombozytenzählung ist bei Vorliegen von Agglutinaten nicht möglich (Meyer, 2005; Suchfort, 1998). Somit sind schlechte Korrelationen zu erwarten. Auffallend sind jedoch die Ergebnisse des pocH-100iV Diff, der im Vergleich zum Vet ABC in der



## 6. Zusammenfassung

Studie von Becker et al. mit derselben Technologie einen deutlich niedrigeren Korrelationskoeffizienten aufweist (Becker, 2007).

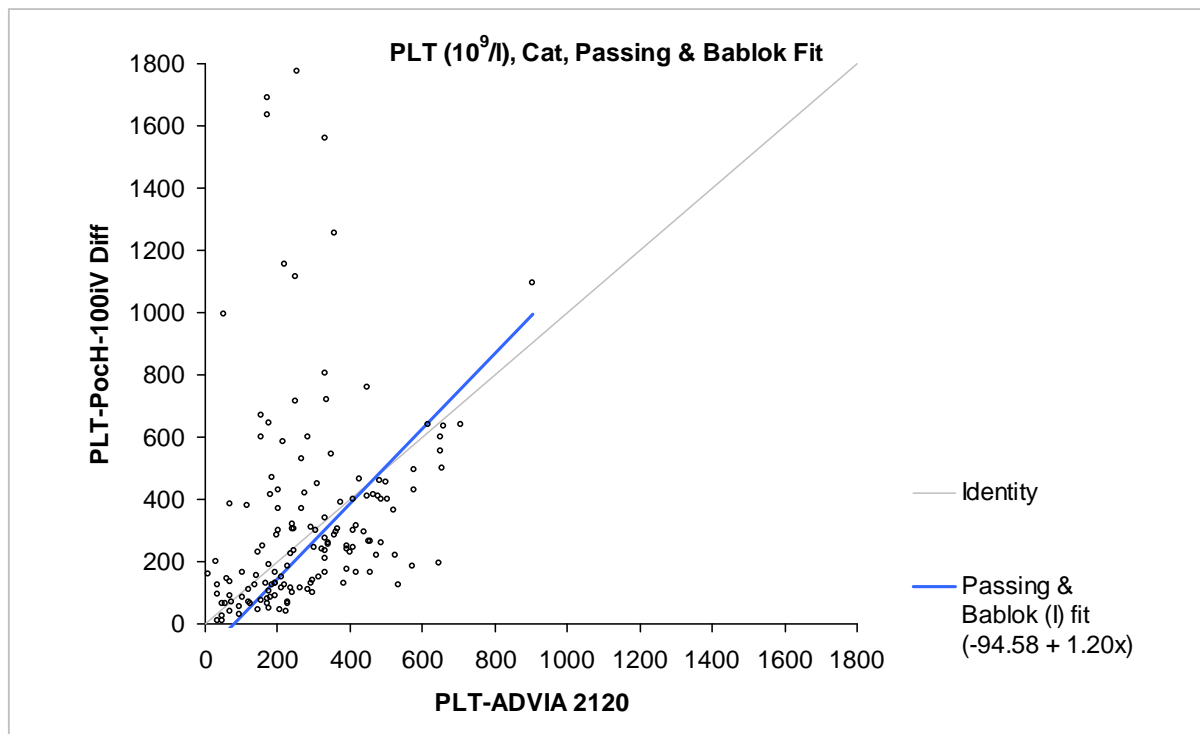


Abbildung 5.3: Passing und Bablok Regression, X-Achse: PLT des ADVIA 2120, Y-Achse: PLT des pochH-100iV Diff, Tierart Katze,  $r = 0,26$  (übernommen aus linearer Regression)

Aus Abbildung 5.3 wird ersichtlich, dass einige Proben des pochH-100iV Diff einen deutlich höheren Thrombozytenwert ergeben als der ADVIA 2120.

In den folgenden Abbildungen werden Beispiele aus den Messergebnissen des pochH-100iV Diff herausgegriffen:

## 6. Zusammenfassung

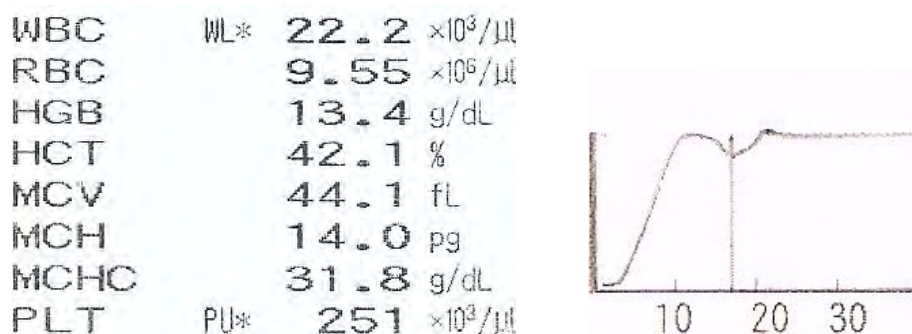


Abbildung 5.4: Ausdruck eines Datenreportes vom pochH-100iV Diff, Tierart Katze (ID: 9002988102). Die Thrombozytenzahl ist mit einer Fehlermeldung PU\* gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass der obere Diskriminator der Thrombozytenmessung nicht zuverlässig gesetzt werden konnte. Betrachtet man das nebenstehende Histogramm der Thrombozytenzählung, liegt der Diskriminator in einem kleinen Tal. Ein eindeutiges Tal kann anhand der Größenbestimmung der Zellen nicht identifiziert werden. Thrombozytenagglutinate oder Überschneidung von großen Thrombozyten und kleinen Erythrozyten können hierfür verantwortlich sein.

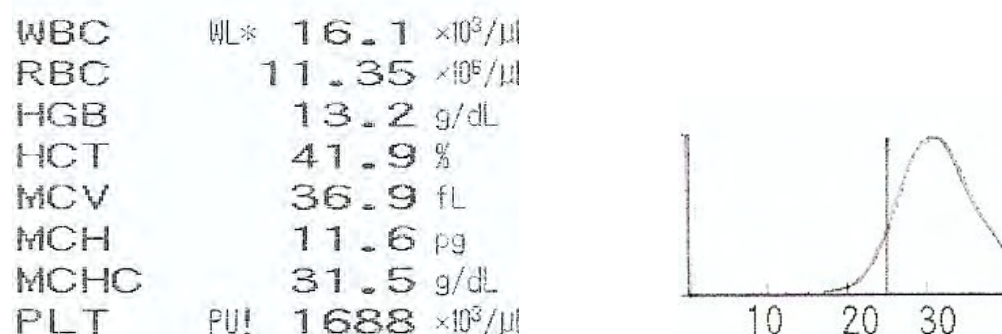


Abbildung 5.5: Ausdruck eines Datenreportes des pochH-100iV Diff, Tierart Katze (ID: 9002993002). Laut Thrombozytenzählung würde hier eine hochgradige Thrombozytose vorliegen. Dass der obere Diskriminator der Thrombozyten nicht zuverlässig gesetzt werden konnte, wird anhand der Fehlermeldung (PU!) verdeutlicht. „!“ zeigt eine Überschreitung der Linearität an. Betrachtet man das Histogramm der Thrombozytenzählung, fehlt im Vergleich zur oberen Abbildung die Zellpopulation links des Diskriminators. Dieser wurde mitten in die ansteigende Kurve der Population der Erythrozyten gesetzt, die sich aufgrund des kleinen MCVs der Erythrozyten in dieser Probe weiter links auf der Größenachse befindet und somit in ihrem Anfangsteil den Thrombozyten zugeordnet wird. Somit wird deutlich, dass die Thrombozytose falsch ist. Im Ausstrich können außerdem Thrombozytenagglutinate festgestellt werden.

## 6. Zusammenfassung

---

Eine manuelle Verschiebung der Diskriminatoren würde die Thrombozytenzahl korrigieren. Alle Messergebnisse, die laut pocH-100iV Diff „überschätzt“ werden, sind anhand von Fehlermeldungen und durch Betrachtung der Histogramme und Diskriminatoren zu identifizieren.

Die Thrombozytenzählung im Vergleich XT-2000iV und ADVIA 2120 hat gute Ergebnisse erzielt. Eine verbesserte Erkennung der Thrombozyten kann anhand der fortgeschrittenen Technologien der beiden Geräte erklärt werden. Der ADVIA 2120 misst mittels zweidimensionaler Thrombozytenanalyse die Größe und die Dichte dieser Zellen. Eine bessere Unterscheidung sowohl von Erythrozyten als auch Erythrozytenmembranen und -fragmenten im Vergleich zum Vorgängermodell Technicon H\*1 konnte in der Studie von Meyer et al. dargestellt werden (Meyer, 2005).

Der XT-2000iV weist neben der Impedanztechnologie eine fluoreszenzoptische Thrombozytenmessung auf. Diese Doppelbestimmung wird als interne Qualitätskontrolle betrachtet. Bei der Messung von Katzenblut wird die Analyse des optischen Thrombozytenkanals auf den Ergebnisreport übertragen.

Der Bias ist nahe Null, jedoch beträgt die 95%ige Übereinstimmungsgrenze -142,7 bis 150,4. Die Unterschiede zwischen den beiden Geräten sind somit teilweise durchaus von klinischer Relevanz.

Ein Vorteil des ADVIA 120/2120 ist die Messung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten. Agglutinierte oder stimulierte Thrombozyten machen eine Formveränderung, Schwellung und Degranulation durch. Die Degranulation führt zur Expression von Oberflächenantigenen, die mittels Durchflusszytometrie detektiert werden können.

Mit Hilfe des MPC (mean platelet component) des ADVIAs kann eine Aussage über den Aktivierungsgrad der Thrombozyten getroffen werden (Meyer, 2005). Äußere Umstände, wie die Blutentnahme, das verwendete Antikoagulanzen sowie die Lagerungsdauer beeinflussen den Aktivierungsgrad.

Beim Hund konnte ein hoher Aktivierungsgrad der Thrombozyten bei septischen oder nicht septischen entzündlichen Prozessen nachgewiesen werden (Moritz et al., 2005).

Der XT-2000iV misst die „optischen“ Thrombozyten im Retikulozytenkanal. Anhand der Größe und der Fluoreszenzintensität der DNA/RNA-Anfärbung können reife und unreife Thrombozyten unterschieden werden. Der XT-2000iV wird als erstes

## 6. Zusammenfassung

automatisches Hämatologiesystem zur Messung von retikulierten, das heißt unreifen Thrombozyten bei Hunden beschrieben. Dies kann als Verlaufskontrolle bei Thrombozytopenien von Vorteil sein (Pankraz et al., 2009).

<b>PLT, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>r</b>	<b>intercept</b>	<b>slope</b>	<b>bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,26	-94,58	1,20	48,0
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,89	8,44	0,93	3,2
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,767	38,16	0,72	-44,71
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,883	-27,51	1,18	22,98
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,871	--	--	--
Neuerer 2005 <sup>4</sup>	CELL-DYN 3500	0,598	3,558	0,619	--

*Tabelle 5.6: Ergebnisvergleich der Thrombozytenzählung der eigenen Studie mit drei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1</sup> ADVIA 2120, <sup>2</sup> ADVIA 120, <sup>3</sup> Technicon H\*1, <sup>4</sup> manuell*

### 5.4 Differentialblutbild

Bezüglich der Leukozytendifferenzierung muss berücksichtigt werden, dass die manuelle Differenzierung eine geringe Reproduzierbarkeit hat und die Auswertung von der Erfahrung des Betrachters aber auch von der Verteilung der Leukozyten im Ausstrich abhängig ist. Die Präzision einer manuellen Blutzellzählung erhöht sich, je größer der Umfang der untersuchten Zellen ist. Insbesondere im Hinblick auf Zellen, deren Vorkommen im Blut nur gering ist, muss statistisch gesehen eine sehr hohe Variabilität der Resultate in Betracht gezogen werden. Rümke führt als Beispiel bei den eosinophilen Granulozyten auf, dass bei einer Differenzierung von 100 Leukozyten und einem tatsächlichen Wert von 6 % eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut eine Variabilität von 2% bis 13% gefunden werden kann (Rümke, 1960).

Zusätzlich ist eine Identifizierung und Einteilung der Zellen, ob sie nun pathologisch verändert sind oder nicht, stark vom jeweiligen Betrachter abhängig. Hinzu kommen Abweichungen in der Präparation der Ausstriche angefangen von der Ausstrichtechnik, der unterschiedlichen Verteilung der Leukozyten oder

## 6. Zusammenfassung

Färbeartefakte. Vergleicht man die maximal akzeptierbare Impräzision aus der Humanmedizin, können bei Hund und Katze die Anforderungen lediglich für die neutrophilen Granulozyten erfüllt werden. Eine Auszählung von 500 Zellen erscheint dafür optimal. Jedoch scheinen auf Grund des physiologisch geringeren Vorkommens von Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten selbst bei einer Auszählung von 500 Zellen die Anforderungen nicht erfüllbar (Kjelgaard-Hansen und Jensen, 2006).

Trotzdem schreibt das NCCLS eine manuelle Leukozytendifferenzierung als Referenzmethode vor (Koepke et al., 1992).

Auf Grund der technischen Unterschiede werden im Folgenden der Laser-basierte XT-2000iV und der Impedanz-basierte poch100iV Diff separat mit entsprechenden Vergleichsgeräten aus anderen Studien gegenübergestellt.

### 5.4.1 Differentialblutbild des XT-2000iV

Betrachtet man die Zählung der neutrophilen Granulozyten, zeigen der XT-2000iV und der ADVIA 2120 einen vergleichbaren Bias und eine 95%ige Übereinstimmungsgrenze. In der Studie von Becker et al. kann ein höherer Korrelationskoeffizient ( $r = 0,985$ ) und ein Bias von  $-0,97$  erreicht werden (Becker, 2007).

<b>Neutrophile Granulozyten, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>r</b>	<b>intercept</b>	<b>Slope</b>	<b>Bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,88	-3,70	1,00	-4,14
Eigene Studie <sup>1</sup>	ADVIA 2120	0,894	-0,73	0,95	-3,88
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,985	-0,07	0,91	-0,97
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,839	--	--	--

*Tabelle 5.7: Ergebnisvergleich der neutrophilen Granulozyten der eigenen Studie mit zwei weiteren Studien, Tierart Katze.*

*Vergleichsmethode: <sup>1 2 3</sup> manuell*

## 6. Zusammenfassung

An den folgenden graphischen Darstellungen des XT-2000iV im Vergleich mit der manuellen Differenzierung sind einige Ausreißer im unteren Viertel der Passing und Bablok Regressions-Geraden nachvollziehbar.

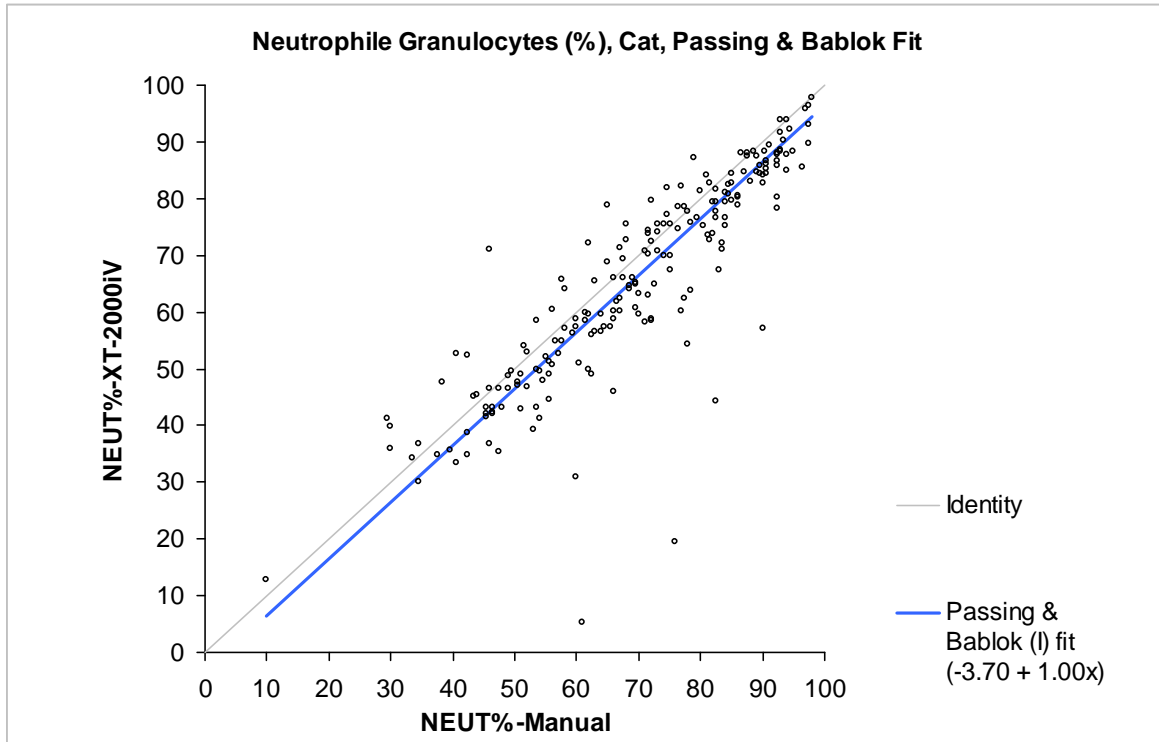


Abbildung 5.6: Neutrophile Granulozyten (%), Passing und Bablok Regression des XT-2000iV, Referenzmethode: manuelles Differentialblutbild, Tierart Katze

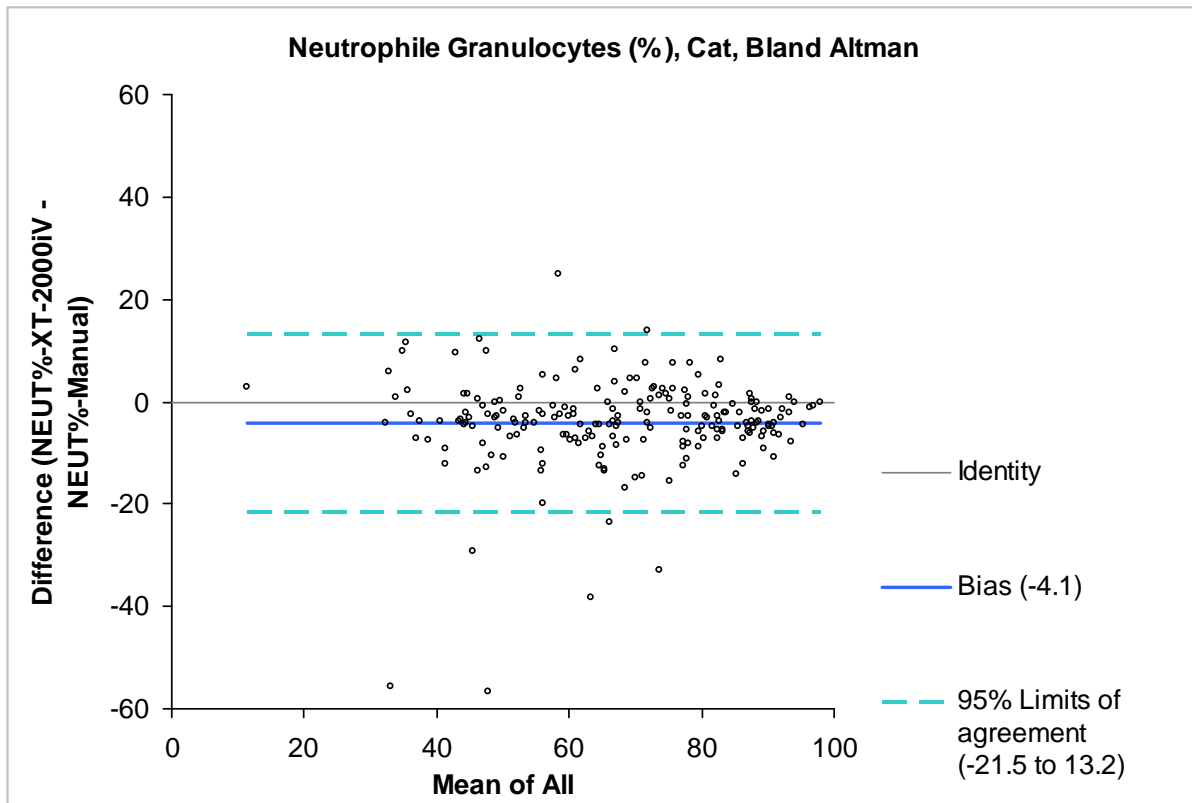


Abbildung 5.7: Neutrophile Granulozyten (%), Bland-Altman Analyse des XT-2000iV, Referenzmethode: manuelles Differentialblutbild, Tierart Katze

Die meisten Vergleichsmessungen sind um die Winkelhalbierende gestreut (Abbildung 5.6). Einige Ausreißer verdeutlichen jedoch, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zum manuellen Differentialblutbild falsch gewertet wurde. Eine alleinige Beurteilung der Zahlenwerte kann bei pathologischen Proben zu falschen Resultaten führen. Diesbezüglich sind eine Interpretation der Scattergramme und eine Verifizierung durch eine manuelle Differenzierung unumgänglich. Ein geschulter Anwender sollte anhand der Scattergramme Hinweise auf bestimmte pathologische Veränderungen erhalten (z.B. Stabkernige Granulozyten, Blasten). Einige Beispiele sind im Folgenden aufgeführt.

## 6. Zusammenfassung

WBC	8.15	[10 <sup>3</sup> /uL]		
RBC	10.15	[10 <sup>6</sup> /uL]		
HGB	13.5	[g/dL]		
HCT	46.0	[%]		
MCV	45.3	[fL]		
MCH	13.3	[pg]		
MCHC	29.3	[g/dL]		
PLT &	315	[10 <sup>3</sup> /uL]		
RDW-SD	32.5	[fL]		
RDW-CV	22.9	[%]		
PDW	---	[fL]		
MPV	---	[fL]		
P-LCR	---	[%]		
PCT	---	[%]		
NEUT	5.39	[10 <sup>3</sup> /uL]	66.1	[%]
LYMPH	1.71	[10 <sup>3</sup> /uL]	21.0	[%]
MONO	0.39	[10 <sup>3</sup> /uL]	4.8	[%]
EO	0.65	[10 <sup>3</sup> /uL]	8.0	[%]
BASO	0.01	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.1	[%]
RET	0.75	[%]	0.0761	[10 <sup>6</sup> /uL]
IRF	5.7	[%]		
LFR	94.3	[%]		
MFR	5.7	[%]		
HFR	0.0	[%]		

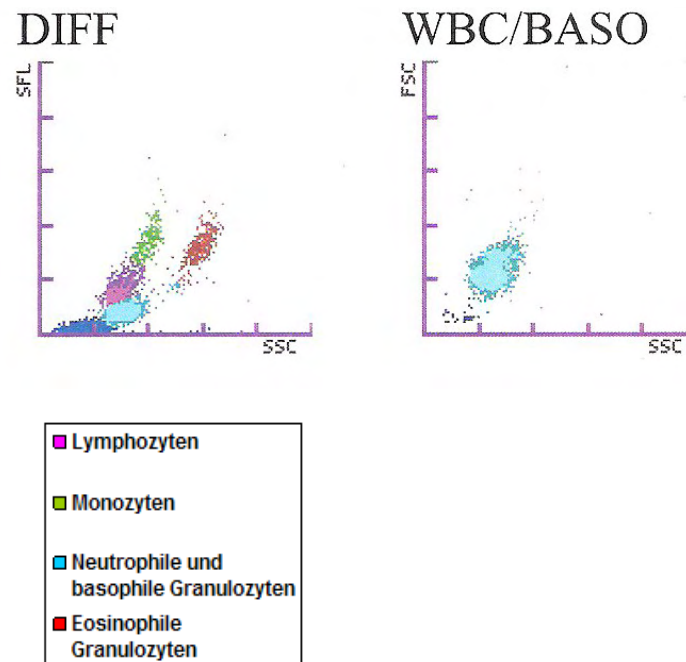


Abbildung 5.8: Ausschnitt aus dem Datenreport des XT-2000iV, Tierart Katze, ID: 9003220302 Maine Coon Katze, gesund. (Die oben aufgeführte Farblegende gilt für das DIFF Scattergramm)

Im Scattergramm des Diff-Kanals von Abbildung 5.8 sind die einzelnen Zellpopulationen deutlich gruppiert und können eindeutig zugeordnet werden. Das Differentialblutbild des XT-2000iV und die manuelle Differenzierung stimmen gut überein.



## 6. Zusammenfassung

WBC	22.90	[10 <sup>3</sup> /uL]		
RBC	2.27	- [10 <sup>6</sup> /uL]		
HGB	4.2	- [g/dL]		
HCT	17.2	- [%]		
MCV	75.8	+ [fL]		
MCH	18.5	+ [pg]		
MCHC	24.4	[g/dL]		
PLT &	47	[10 <sup>3</sup> /uL]		
RDW-SD	48.6	[fL]		
RDW-CV	19.2	[%]		
PDW	----	[fL]		
MPV	----	[fL]		
P-LCR	----	[%]		
PCT	----	[%]		
NEUT	10.56	[10 <sup>3</sup> /uL]	46.1	[%]
LYMPH	3.16	[10 <sup>3</sup> /uL]	13.8	[%]
MONO	9.01	+ [10 <sup>3</sup> /uL]	39.3	+ [%]
EO	0.13	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.6	[%]
BASO	0.04	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.2	[%]
RET	0.61	[%]	0.0138	[10 <sup>6</sup> /uL]
IRF	16.0	[%]		
LFR	84.0	[%]		
MFR	13.2	[%]		
HFR	2.8	[%]		

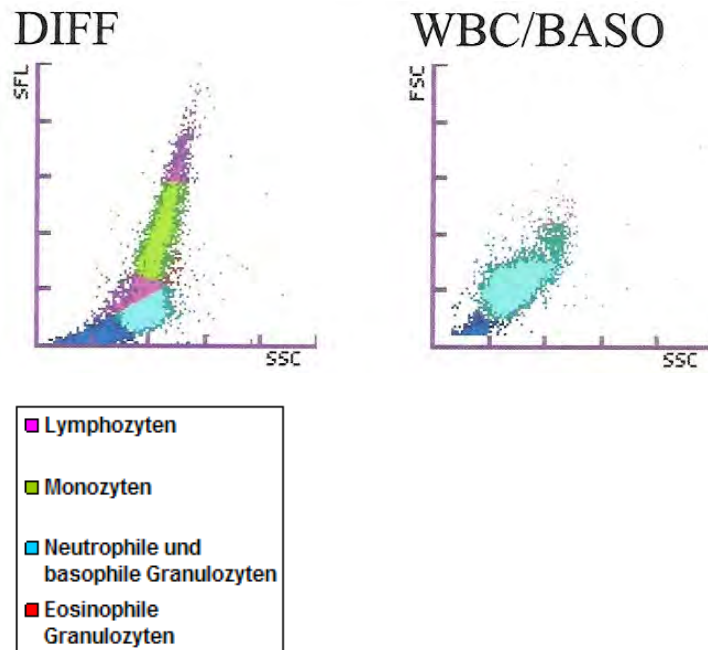


Abbildung 5.9: Ausschnitt aus dem Datenreport des XT-2000iV, Tierart Katze, ID: 9003060502

Europäische Kurzhaarkatze mit FeLV-Infektion, lymphatische Blasten im Ausstrich.  
(Die oben aufgeführte Farblegende gilt für das DIFF Scattergramm)

Wie aus dem Scattergramm des DIFF-Kanals (Abb.5.9) ersichtlich wird, ist eine Unterscheidung der Leukozytenpopulationen nicht möglich. Die Grenzlinien zwischen den einzelnen Zellpopulationen sind optisch nicht nachvollziehbar.

Auf Grund der hohen Anzahl an lymphatischen Blasten im peripheren Blut scheinen die Lymphozyten und Monozyten nicht mehr gut voneinander abgrenzbar zu sein.

Lymphatische Blasten scheinen auf Grund ihres größeren Zellkerns einen vermehrten Anteil an fluoreszierender DNA zu enthalten und sind im Scattergramm höher auf der y-Achse zu finden. Somit lässt sich eine Überlappung mit der Population der Monozyten erklären. Interpretiert man die Zahlen der Ergebnisse zusammen mit dem Scattergramm, kann die Monozytose als fraglich beziehungsweise falsch betrachtet werden. Bei einem derartigen Scattergramm sollten die Resultate des Differentialblutbildes immer angezweifelt und mittels Ausstrich verifiziert werden.

## 6. Zusammenfassung

WBC	14.24	[10 <sup>3</sup> /uL]		
RBC	7.44	[10 <sup>6</sup> /uL]		
HGB	10.2	[g/dL]		
HCT	35.6	[%]		
MCV	47.8	[fL]		
MCH	13.7	[pg]		
MCHC	28.7	[g/dL]		
PLT &	210	[10 <sup>3</sup> /uL]		
RDW-SD	29.5	[fL]		
RDW-CV	19.3	[%]		
PDW	----	[fL]		
MPV	----	[fL]		
P-LCR	----	[%]		
PCT	----	[%]		
NEUT	10.65	[10 <sup>3</sup> /uL]	74.7	[%]
LYMPH	2.69	[10 <sup>3</sup> /uL]	18.9	[%]
MONO	0.74	[10 <sup>3</sup> /uL]	5.2	[%]
EO	0.15	[10 <sup>3</sup> /uL]	1.1	[%]
BASO	0.01	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.1	[%]
RET	0.49	[%]	0.0365	[10 <sup>6</sup> /uL]
IRF	6.0	[%]		
LFR	94.0	[%]		
MFR	4.3	[%]		
HFR	1.7	[%]		

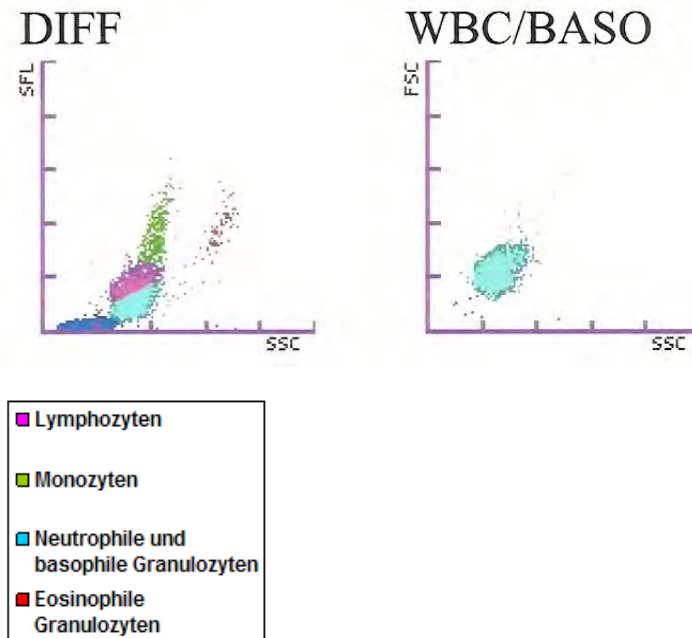


Abbildung 5.10: Ausschnitt aus dem Datenreport des XT-2000iV, Tierart Katze, ID: 900412702

Europäische Kurzhaarkatze mit Abszess, 19 % stabkernige neutrophile Granulozyten im Ausstrich. (Die oben aufgeführte Farblegende gilt für das DIFF Scattergramm)

Im Beispiel von Abbildung 5.10 sieht man im Scattergramm des Diff-Kanals eine zusammenhängende Wolke der Lymphozyten- und Neutrophilen/Basophilen-Population. In der manuellen Differenzierung konnte eine Linksverschiebung der neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Der erhöhte DNA-Gehalt der stabkernigen Granulozyten hat zur Folge, dass diese höher auf der y-Achse erscheinen und mit den Lymphozyten überlappen. Auch dieses pathologische Blutbild scheint eine genaue Differenzierung der Zellen unmöglich zu machen.

In einer anderen Studie zur Evaluation des XT-2000iV im Vergleich zum Cell-Dyn 3500 sind ähnliche Verschiebungen der Zellpopulationen beobachtet worden. Linksverschiebungen und toxische Veränderungen der Neutrophilen führen dazu, dass sie mit der Population der Lymphozyten verschmelzen und anhand ihres DNA-/RNA-Gehaltes nicht mehr zu unterscheiden sind (Lilliehook und Tvedten, 2009).

## 6. Zusammenfassung

WBC	2.65	[10 <sup>3</sup> /uL]	
RBC	5.70	[10 <sup>6</sup> /uL]	
HGB	8.3	[g/dL]	
HCT	30.2	[%]	
MCV	53.0	[fL]	
MCH	14.6	[pg]	
MCHC	27.5	[g/dL]	
PLT &	82	[10 <sup>3</sup> /uL]	
RDW-SD	30.6	[fL]	
RDW-CV	16.5	[%]	
PDW	----	[fL]	
MPV	----	[fL]	
P-LCR	----	[%]	
PCT	----	[%]	
NEUT	0.14	[10 <sup>3</sup> /uL]	5.2 - [%]
LYMPH	0.85	[10 <sup>3</sup> /uL]	32.1 [%]
MONO	1.64 +	[10 <sup>3</sup> /uL]	61.9 + [%]
EO	0.02	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.8 [%]
BASO	0.00	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.0 [%]
RET	0.30	[%]	0.0171 [10 <sup>6</sup> /uL]
IRF	11.3	[%]	
LFR	88.7	[%]	
MFR	8.5	[%]	
HFR	2.8	[%]	

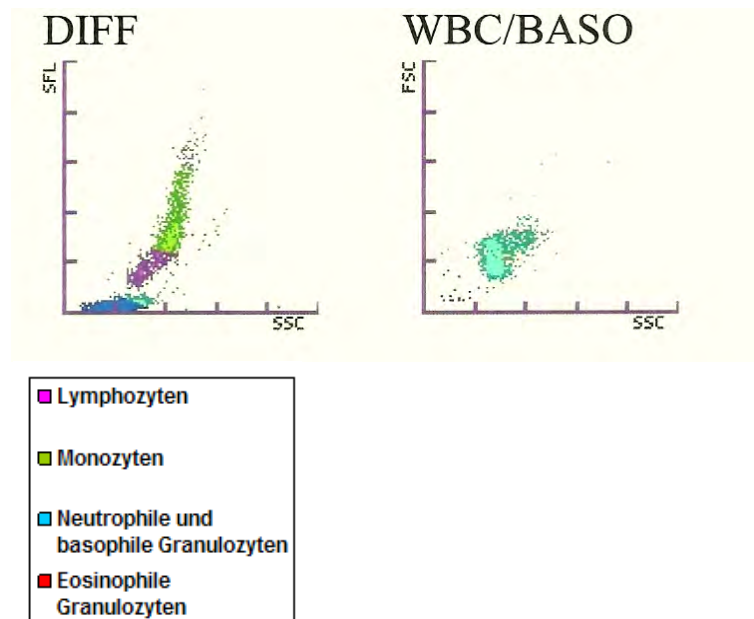


Abbildung 5.11: Ausschnitt aus dem Datenreport des XT-2000iV, Tierart Katze, ID: 9002915502

Maine Coon Katze mit feliner infektiöser Peritonitis, 10 % stabkernige neutrophile Granulozyten im Ausstrich.

Manuelle Differenzierung: Eos 0,5%; 10% Stäbe; 51% Segmentkernige; 37,5% Lymphozyten; 1% Monozyten

(Die oben aufgeführte Farblegende gilt für das DIFF Scattergramm)

Abbildung 5.11 ist der Ergebnisreport einer Katze mit einer hochgradigen Leukopenie und mittelgradigen Thrombopenie. Das Differentialblutbild stimmt mit der manuellen Differenzierung nicht überein. Wiederum können Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten nicht unterschieden werden. Der prozentuale Anteil der Neutrophilen beim XT 2000iV ist in diesem Fall sogar um das Zehnfache niedriger als in der manuellen Differenzierung.

Da die physiologische Anzahl der Lymphozyten gering ist, sind lineare Zusammenhänge und die sich daraus ergebenden Korrelationskoeffizienten stark von der Anzahl und der Verbreitung der Lymphozytenzahlen der einzelnen Studien abhängig. Diese Faktoren können der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien sein. In dieser Studie ist die manuelle Differenzierung von 200 Zellen als limitierender Faktor zu bewerten. Der zu erwartende Variationskoeffizient ist sogar bei einer Zählung von 500 Zellen pro Blutaussstrich zu hoch, um optimale Vergleichszahlen zu erhalten (Kjelgaard-Hansen und Jensen, 2006). Da ein automatisches Hämatologiesystem eine viel größere Anzahl an Zellen differenzieren kann, ist eine genauere Differenzierung zu erwarten. Jedoch stellen pathologische Blutbildveränderungen, wie oben anhand der Beispiele (Abbildungen 5.9 bis 5.11) gezeigt, Einschränkungen für die Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen dar.

<b>Lymphozyten, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>r</b>	<b>intercept</b>	<b>slope</b>	<b>bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,90	1,81	1,11	1,68
Eigene Studie <sup>1</sup>	ADVIA 2120	0,927	4,43	0,93	2,8
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,769	--	--	-0,55
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,824	--	--	--

*Tabelle 5.8: Ergebnisvergleich der Lymphozyten der eigenen Studie mit zwei weiteren Studien, Tierart Katze.*

*Vergleichsmethode: <sup>1 2 3</sup> manuell*

Die Monozyten sind optisch sehr variable Zellen und aus diesem Grund schwierig einzuordnen. Zudem kommen sie im peripheren Blut nur in einer geringen Anzahl vor und können somit im Blutaussstrich nicht immer erfasst werden. Die Korrelation ist auf Grund der geringen Datenverteilung niedrig und kann somit nicht zur Bewertung der Methoden verwendet werden.

<b>Monozyten, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>r</b>	<b>intercept</b>	<b>slope</b>	<b>bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,37	1,43	1,14	2,49
Eigene Studie <sup>1</sup>	ADVIA 2120	0,400	-14,68	6,88	0,74
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,687	--	--	1,19
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,419	--	--	--

*Tabelle 5.9: Ergebnisvergleich der Monozyten der eigenen Studie mit zwei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1 2 3</sup>manuell*

Die eosinophilen Granulozyten erzielen beim XT-2000iV die besten Ergebnisse. Möglicherweise ist die Messmethode des XT-2000iV mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie geeigneter, die eosinophilen Granulozyten der Katze zu erkennen. Auf Grund ihrer inneren Zellstruktur grenzen sie sich deutlich von den anderen Zellpopulationen ab und sind weiter rechts auf der x-Achse dargestellt. In manchen Messungen fällt unterhalb der eigentlichen Population der eosinophilen Granulozyten eine zusätzliche Zellpopulation auf, die in das Gate der Eosinophilen fallen. In weiteren Studien gilt zu überprüfen, ob es sich dabei zum Beispiel um Thrombozytenaggregate handeln könnte.

Eosinophile Granulozyten der Katze sind peroxidasenegativ und können im Peroxidasekanal des ADVIA 2120 nicht von den neutrophilen Granulozyten unterschieden werden. In einer vorangegangenen Studie wird eine Softwareadaptation des ADVIA 120 vorgenommen. Die eosinophilen Granulozyten der Katze werden nun im Retikulozytenkanal erfasst (Meyer, 2005).

<b>Eosinophile Granulozyten, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>r</b>	<b>intercept</b>	<b>slope</b>	<b>bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	XT-2000iV	0,90	0,94	0,33	0,04
Eigene Studie <sup>1</sup>	ADVIA 2120	0,800	1,54	0,75	0,43
Becker 2007 <sup>2</sup>	LaserCyte	0,646	--	--	0,29
Meyer 2005 <sup>3</sup>	ADVIA 120	0,622	--	--	--

*Tabelle 5.10: Ergebnisvergleich der eosinophilen Granulozyten der eigenen Studie mit zwei weiteren Studien, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1 2 3</sup>manuell*

Auf Grund des seltenen Vorkommens basophiler Granulozyten bei der Katze kann in der vorliegenden Studie kein Beispiel aufgewiesen werden. Basophile von Hunden und Katzen scheinen sich von denen des Menschen zu unterscheiden, so dass sie vom XT-2000iV und von anderen laserbasierten Hämatologiesystemen nicht als solche zu identifizieren sind. Ein unterschiedliches Lyseverhalten scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (Lilliehook und Tvedten, 2009).

Bezüglich der Leukozytendifferenzierung des XT-2000iV lässt sich zusammenfassen, dass durch kombinierte Interpretation der Zahlenwerte und der WBC-Scattergramme durch einen geübten Anwender pathologische von nicht-pathologischen Proben gut zu unterscheiden sind. In der humanmedizinischen Software sind Fehlermeldungen bezüglich pathologischer Zellmorphologien, wie zum Beispiel „Linksverschiebung?“, „Blasten?“ oder „NRBC? (nucleated red blood cells= Normoblasten)“ vorhanden (Sysmex, 2005). Hervorzuheben ist, dass diese Verdachtsmeldungen sind und stets eine Überprüfung durch Beurteilung eines Blutausstriches erfordern. Auf Grund von speziesspezifischen Unterschieden bezüglich der Zellmorphologie können die Scattergramme, die für bestimmte pathologische Veränderungen beim Menschen sprechen, nicht ohne weiteres auf verschiedene Tierarten übertragen werden. Diesbezüglich bedarf es weiterer Überprüfungen von ausgesuchten pathologischen Blutbildveränderungen, um so dem Anwender zu ermöglichen, Verdachtsdiagnosen anhand von Scattergrammen stellen zu können.

### 5.4.2 Differentialblutbild des pocH-100iV Diff

Die Differenzierung von Leukozyten durch die Impedanzmethode ist erschwert. Die meisten Hämatologiesysteme dieser Art beschränken sich auf eine Einteilung in drei verschiedene Zellpopulationen. Der pocH-100iV Diff separiert in OTHR (Abkürzung stehend für „others“), bestehend aus neutrophilen Granulozyten und Monozyten, sowie Lymphozyten und eosinophile Granulozyten. Das automatische Blutzählgerät CA 530-Vet separiert in eine Population bestehend aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, eine aus Lymphozyten und eine aus Monozyten und basophilen Granulozyten. In einer Evaluation des letzteren Gerätes konnte in 21% der Fälle kein Differentialblutbild erhoben werden. Von den evaluierten Tierarten Hund, Katze und Pferd war die Katze am häufigsten betroffen (Roleff et al., 2007). Eine mangelhafte Separierung zwischen Erythrozyten und Thrombozyten der Katze spielte bei 89% der Fehlermeldungen des Heska analyzers und bei 44% derer des Scil Vet ABC eine Rolle (Becker et al., 2008). Neben großen Thrombozyten können dies Thrombozytenaggregate beeinflussen. In manchen Fällen führen Aggregate zu falsch hohen oder falsch niedrigen Leukozytenzählungen (Knoll, 2006).

Mittels Impedanzmethode die eosinophilen Granulozyten von den anderen Zellarten zu unterscheiden ist schwierig. So kommen andere technologisch ähnlich aufgebaute Geräte auf vergleichbare nicht zufrieden stellende Ergebnisse. Der MS45 (Melet Schloesing Pharmaceuticals) hat in der Studie von Becker einen Korrelationskoeffizienten von 0,712 und ein bias von 0,13 (Becker, 2007). Der Vet ABC (Scil) gibt keine Zahl der eosinophilen Granulozyten sondern lediglich einen „Eo-Alarm“ an.

Dem zu folge ist eine Separierung der Leukozyten anhand ihrer Größe methodisch schwer umzusetzen und mit Vorsicht zu interpretieren. Das Differentialblutbild eines Impedanzgerätes sollte als Richtwert verwendet und stets mittels Blutaussstrich verifiziert werden.

In den folgenden Tabellen wird der pocH-100iV Diff in der Messung der Lymphozyten dem Scil Vet ABC und in der Messung der eosinophilen Granulozyten dem MS45 gegenüber gestellt. Als Vergleichsmethode findet die manuelle Differenzierung von 200 Leukozyten Anwendung.

## 6. Zusammenfassung

Mittels Impedanzmethode dieses Hämatologiegerätes pocH100iV Diff werden bei 50 von 153 Proben die Leukozyten nicht differenziert. Diese Proben werden mit „\*000“ oder „---“ gekennzeichnet. In den meisten Fällen stellen Thrombozytenagglutinate die zu Grunde liegende Ursache dar, so dass man von einem präanalytischen und nicht von einem gerätebedingten Fehler sprechen kann. Auch pathologische Veränderungen wie Blasten oder eine Linksverschiebungen können bei einer solchen Fehlermeldung eine Rolle spielen.

<b>Lymphozyten, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>r</b>	<b>intercept</b>	<b>slope</b>	<b>Bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH-100iV Diff	0,87	1,81	1,11	5,68
Becker 2007 <sup>2</sup>	Scil Vet ABC	0,876	--	--	-1,12
<b>Eosinophile Granulozyten, Tierart Katze</b>					
<b>Studie</b>	<b>Hämatologiesystem</b>	<b>R</b>	<b>intercept</b>	<b>slope</b>	<b>Bias</b>
Eigene Studie <sup>1</sup>	pocH100iV Diff	0,73	1,65	0,78	0,89
Becker 2007 <sup>2</sup>	MS 45	0,71	--	--	0,13

*Tabelle 5.11 Ergebnisvergleich der Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten der eigenen Studie mit einer weiteren Studie, Tierart Katze*

*Vergleichsmethode: <sup>1 2</sup> manuell*



### 5.5 Retikulozytenzählung

Bei Betrachtung der absoluten Retikulozytenzählung sind die Ergebnisse des XT-2000iV höher als die manuelle Retikulozytenzählung und die Ergebnisse des ADVIA 2120, betrachtet man die Abbildungen 5.12 und 5.14 fällt eine steigende Differenz zwischen den verschiedenen Verfahren bei wachsendem Gehalt der Proben auf. Die zwei verschiedenen Versionen des ADVIA (2120 und 120) stimmen gut miteinander überein (Abb.5.15).

Ein positiver Bias im Vergleich der gemessenen Retikulozyten (XT-2000iV) in Prozent mit der manuellen Zählung wird in einer weiteren Studie beschrieben. Dabei konnte zusätzlich eine gute Korrelation zwischen der Retikulozytenzählung des XT-2000iV und den aggregierten Retikulozyten, definiert mit mehr als 15 Punkten oder einem oder mehr Aggregaten aus ribosomaler RNA gefunden werden. Ein limitierender Faktor war jedoch die geringe Menge an Proben mit einer hohen Anzahl an aggregierten Retikulozyten (n=5) (Lilliehook und Tvedten, 2009). Eine korrekte Unterteilung in aggregierte oder punktierte Formen ist rein subjektiv und kann beispielsweise auf Grund von Färbeartefakten mit Schwierigkeiten verbunden sein. In einer Vergleichsstudie von Blutproben anämischer Hunde zwischen dem LaserCyte und dem ADVIA 120 sowie der manuellen Methode konnte ein negativer bias mit einem proportionalen Fehler gefunden werden. Durch Berechnung von gerätespezifischen Cut-off-Werten und durch Setzen eines Graubereichs, in dem keine Klassifizierung in regenerativ oder nicht-regenerativ möglich ist, konnten die Sensitivität und Spezifität zur Anämieklassifikation beider Geräte verbessert werden (Weissert et al., 2008).

Für diese Studie muss jedoch bedacht werden, dass die ausgewählten Blutproben meist von Katzen mit einem normalen Hämatokrit mit Retikulozyten im Referenzbereich stammen. Aus diesem Grund sollten in weiteren Studien Proben von regenerativen und nicht-regenerativen anämischen Katzen, deren exakte Retikulozytenzahl von klinischer Relevanz ist, untersucht werden. Auf Grund des positiven proportionalen Bias sind die Cut-off-Werte zur Einteilung einer Anämie in regenerativ oder nicht-regenerativ höher als beim ADVIA 2120 einzustufen.

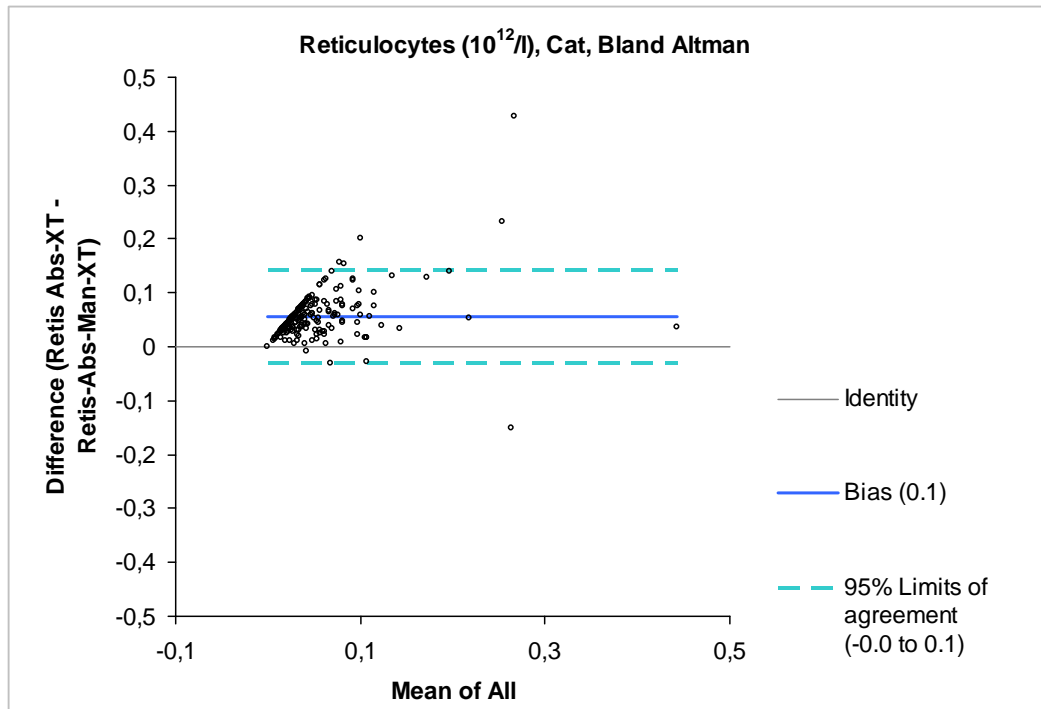


Abbildung 5.12: absolute Retikulozytenzählung, Bland-Altman Analyse des XT-2000iV, Referenzmethode: manuelle Retikulozytenzählung, Tierart Katze

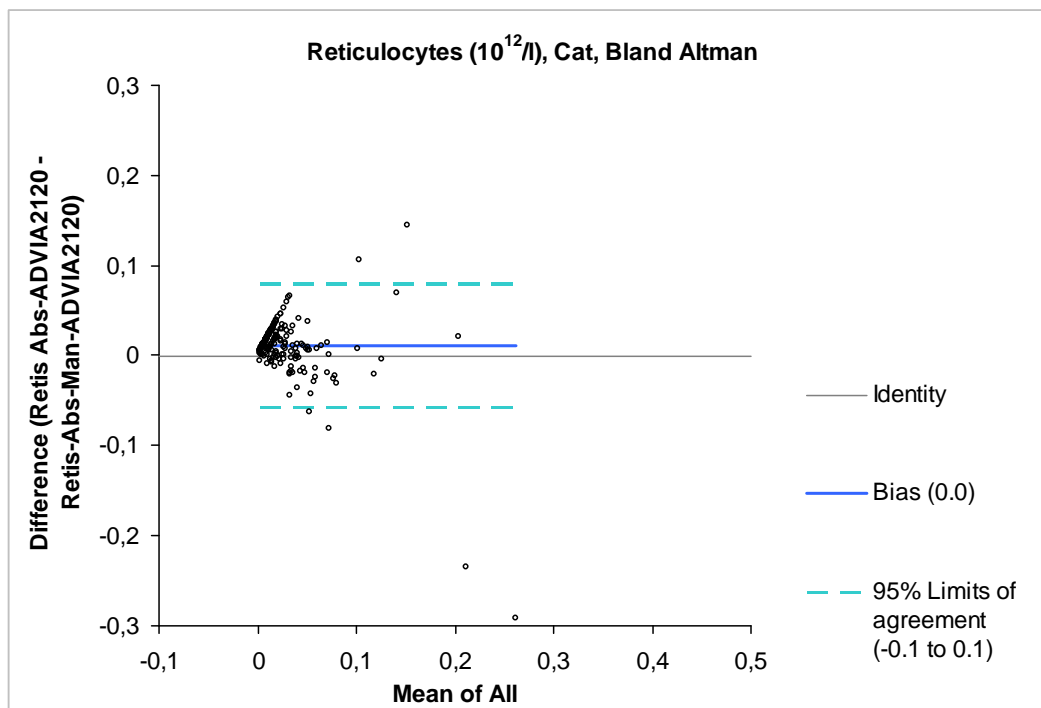


Abbildung 5.13: absolute Retikulozytenzählung, Bland-Altman Analyse des ADVIA 2120, Referenzmethode: manuelle Retikulozytenzählung, Tierart Katze

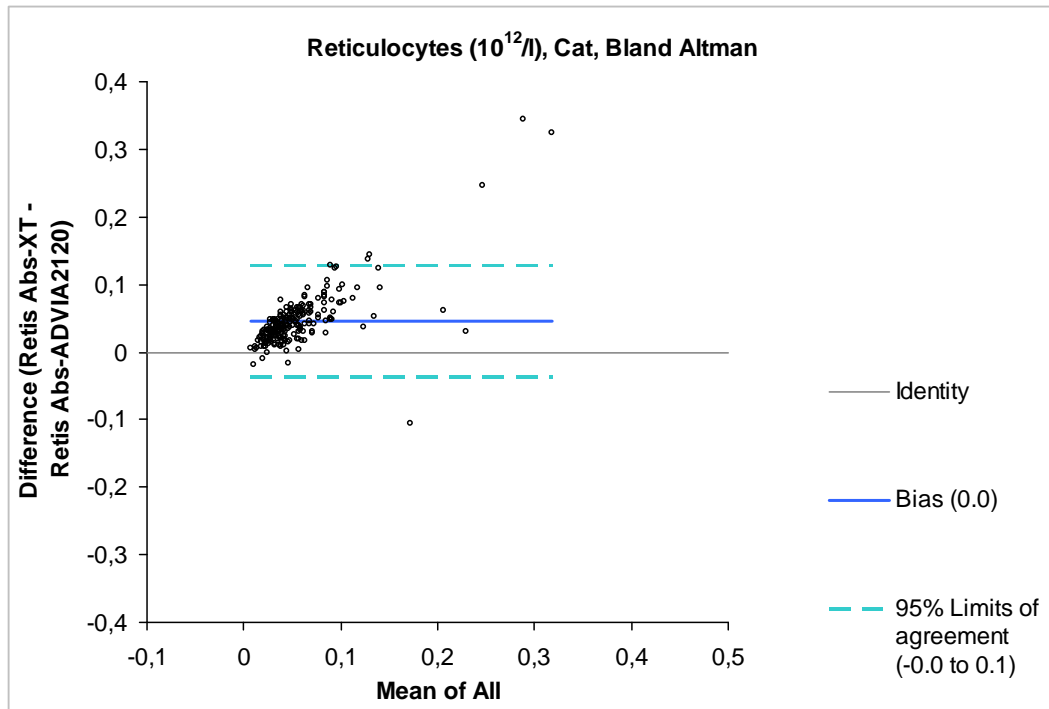


Abbildung 5.14: absolute Retikulozytenzählung, Bland-Altman Analyse des XT-2000iV, Referenzmethode: ADVIA 2120, Tierart Katze

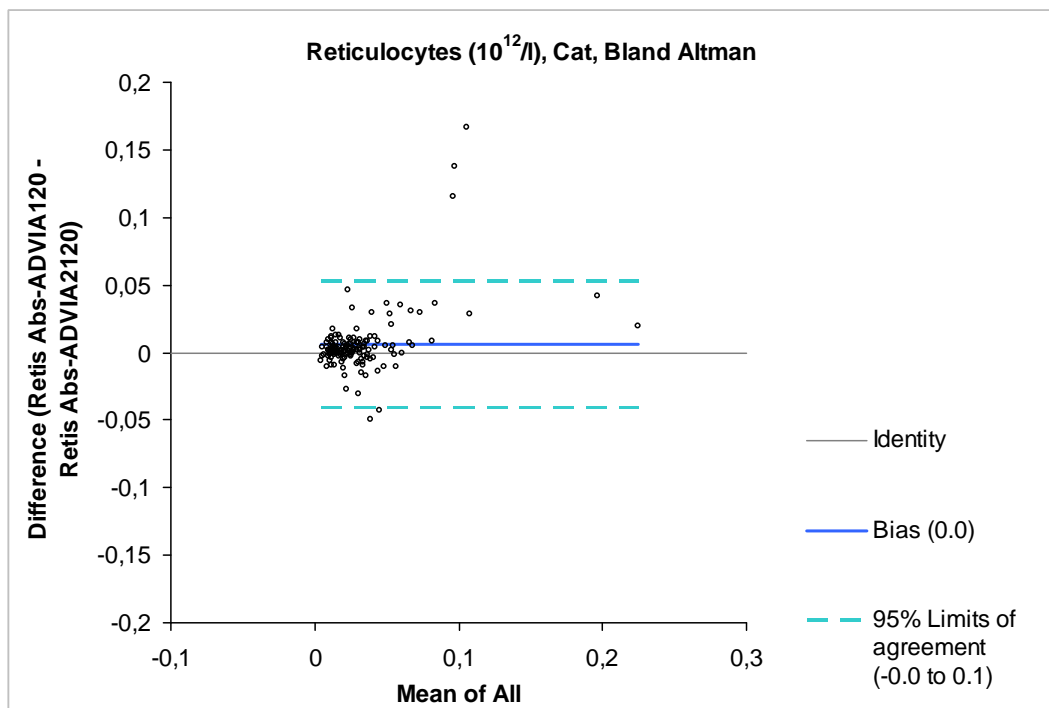


Abbildung 5.15: absolute Retikulozytenzählung, Bland-Altman Analyse des ADVIA 120, Referenzmethode: ADVIA 2120, Tierart Katze

### 5.6 Antikoagulanzvergleich

Für eine optimale hämatologische Analyse ist die Stabilität der Zellmorphologie und der Zellzahl von großer Bedeutung. In der Literatur gilt EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) als das meist verwendete und empfohlene Antikoagulanz (NCCLS, 1996). Die ICSH empfiehlt die Verwendung von K<sub>2</sub>EDTA, da K<sub>3</sub>EDTA einen größeren Verdünnungseffekt aufweist und die Erythrozyten zum Schrumpfen neigen (ICSH, 1993). Bei Verwendung verschiedener Antikoagulanzen ist auf das unterschiedliche Verhalten der Blutzellen zu achten. Mit Heparin antikoaguliertes Blut verändert die Färbereigenschaften der Zellen und wird zur Anwendung in der Hämatologie nicht empfohlen (Macey et al., 2002).

In dieser Studie kann lediglich bei der Messung des MCV (pochH-100iV Diff), der MCHC (XT-2000iV), der Monozyten (XT-2000iV) und der Lymphozyten (XT-2000iV) ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Eine Beeinflussung der Thrombozyten wird nicht festgestellt. Zusätzlich muss bedacht werden, dass auf Grund von Fehlermeldungen eine Beurteilung des Differentialblutbildes beim pochH-100iV Diff im Antikoagulanzvergleich nicht möglich ist.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Stabilität der Thrombozyten in verschiedenen Antikoagulanzen. In einer Studie von Stokol et. al. können vermehrte Aggregatbildungen bei Citratblutproben von Hunden mit Tumoren festgestellt werden. Auf Grund der Thrombozytenaggregate wurden hierbei signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen gezählt als bei EDTA-antikoagulierten Proben. Dies konnte in den jeweiligen Blutaussstrichen bestätigt werden (Stokol und Erb, 2007).

In anderen Studien fallen in den mit Citrat antikoagulierten Blutproben deutlich weniger Thrombozytenagglutinate als in Heparin oder EDTA auf (Meyer, 2005; Moritz und Hoffmann, 1997). Der ADVIA 120 und 2120 ist in der Lage, die Thrombozytenaktivierung zu messen. Die Parameter MPV und MPC dienen dazu. Spezielle Inhibitoren der Thrombozytenaktivierung sollen die präanalytischen Fehler in vitro minimieren. Dafür wird für Humanblut die Verwendung von einer Kombination aus EDTA und CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol) antikoagulierten bei 4°C gekühlten Proben, deren Analyse 60 bis 180 Minuten nach Probenentnahme erfolgen soll, empfohlen (Macey et al., 2002). Auch für die Katze konnte eine

signifikante Steigerung der Thrombozytenzahl und eine Verminderung der Aggregatbildung durch CTAD im Vergleich zu EDTA ermittelt werden (Norman et al., 2001).

Neben morphologischen Veränderungen von Thrombozytenformen kann durch Antikoagulantien eine in vitro Hämagglutination hervorgerufen werden. Dies konnte bei einer Katze nachgewiesen werden, deren Blutplasma eine antikörpermedierte Agglutination von Erythrozyten in Abhängigkeit von EDTA auslöste. Solche Besonderheiten, die in vitro entstehen, sollten nicht mit der Diagnose einer immunmedierten hämolytischen Anämie verwechselt werden (Schaefer et al., 2009). In dieser Studie werden die Messungen der Proben innerhalb von einer Stunde durchgeführt. Jedoch zeigt auch Citrat ein Anschwellen der Thrombozyten, welches im Gegensatz zum EDTA progressiv innerhalb von 1 bis 2 Stunden verläuft (Macey et al., 2002). Ein Anschwellen der Thrombozyten kann zur Aktivierung und folglich zur Bildung von Agglutinen führen. Auf Grund dessen ist nicht auszuschließen, dass dies im zeitlichen Ablauf der Messungen bereits stattgefunden hat. Ausstriche von diesen Proben sind nicht angefertigt worden, so dass das Vorhandensein von Thrombozytenagglutinen nicht überprüft werden kann.

### 5.7 Verlaufsuntersuchungen

Die Verlaufsuntersuchung soll Auskunft darüber geben, wie und wie lange der Anwender die Blutproben lagern kann, bevor sie von den jeweiligen Hämatologiegeräten gemessen werden. Dies gilt insbesondere für solche, die auf Grund ihrer Spezifikationen und hoher Anschaffungskosten nur in Einsendelabors Verwendung finden, wie zum Beispiel der XT-2000iV oder der ADVIA 2120.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des XT-2000iV diskutiert:

Die Parameter WBC, RBC, HGB und MCH sind über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden sowohl bei 4°C als auch bei 22°C stabil. Die maximale Abweichung beträgt 4%. Dies stimmt mit den Angaben der Literatur überein (Meyer, 2005; Suchfort, 1998).

## 6. Zusammenfassung

---

Im Gegensatz dazu sind die Messungen des HCT, MCV und MCHC bei Lagerung weniger stabil. Dies hängt mit einem Anschwellen der Erythrozyten bei längerem Kontakt mit EDTA zusammen. Der Anstieg von HCT und MCV zwischen 12 und 24 Stunden nach Blutentnahme fällt sowohl bei den kühl als auch bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben auf. Nach 24 Stunden beträgt die Abweichung bis zu 12,5%, nach 72 Stunden bis zu 22% vom Ausgangswert. Dementsprechend sinken die berechneten MCHC-Werte. Deutlich langsamer sind die Veränderungen bei den kühl gelagerten Proben.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Überprüfung von Hundebloodproben mit und ohne portosystemischen Shunt ermittelt. Betroffene Hunde weisen oft mikrozytäre Erythrozyten auf. 24 Stunden nach Lagerung der Blutproben weicht das MCV im Mittel 6,05% vom Ausgangswert ab (Goodfellow et al., 2008). Es muss also berücksichtigt werden, dass derartige pathologische Abweichungen bei eingesandten Blutproben kaschiert werden können.

Ähnliche lagerungsbedingte Abweichungen können sowohl bei Hunde- als auch Katzenblut in der Literatur bestätigt werden (Furlanello et al., 2006; Meyer, 2005).

Die Thrombozytenmessung wird stark von der Lagerungsdauer beeinflusst. Schon ab 3 Stunden nach der Blutentnahme kommt es zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl, die nach 60 Stunden deutlich über 75% vom Ausgangswert beträgt (Lagerung bei Raumtemperatur). Bei Lagerung im Kühlschrank ist die Abweichung nach 60 Stunden mit 50% etwas geringer. Möglicherweise sind Thrombozytenagglutinate und deren Auflösung für die Schwankungen der Messungen verantwortlich.

Die Lagerung bei Kühlschranktemperatur ist insbesondere wichtig für die Erhaltung des Differentialblutbildes. Die bei 22°C gelagerten Messungen verändern sich bereits nach 12 Stunden, wobei die bei 4°C gelagerten Proben bis zu 36 Stunden stabil bleiben. Die neutrophilen Granulozyten steigen nach 72 Stunden bis zu 23% (Raumtemperatur) an, wobei die Lymphozyten und Monozyten entsprechend abfallen. Am auffälligsten ist der Unterschied des Lagerungsortes bei den eosinophilen Granulozyten. Bei Raumtemperatur zeigen sie ab 6 Stunden nach der Blutentnahme einen Anstieg, der nach 72 Stunden im Mittel 90% vom Ausgangswert abweicht. Kühl gelagert beträgt nach 72 Stunden die Abweichung 17%.

## 6. Zusammenfassung

---

Möglicherweise werden im Messbereich (Gate) der eosinophilen Granulozyten Zelltrümmer miterfasst.

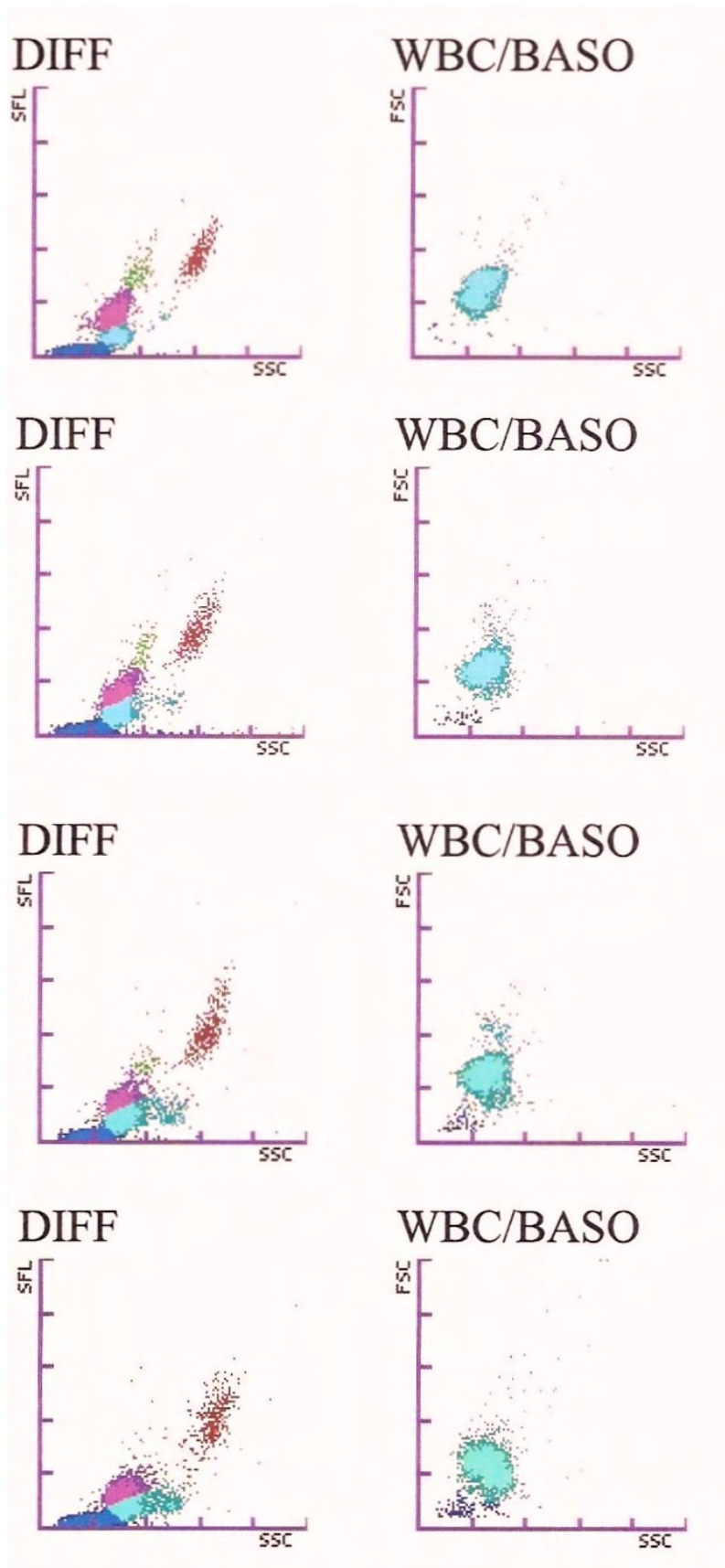


Abbildung 5.16: Datenreporte aus dem DIFF- und WBC/BASO-Kanal, Blutproben der Katze „Cleo“, gelagert bei 22°C, gemessen sofort (oberstes Bild), 12, 36 (mittlere Bilder) und 72 Stunden (unterstes Bild) nach Blutentnahme



## 6. Zusammenfassung

---

Aus den Scattergrammen von Abbildung 5.16 kann man entnehmen, dass die Populationen der Lymphozyten und Monozyten (pinke und grüne Wolke) im Verlauf der Messungen in die Population der neutrophilen Granulozyten fällt. Dies würde bedeuten, dass die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zellen geringer wird und somit die einzelnen Zellpopulationen nicht mehr voneinander unterscheidbar sind.

Wegen fortschreitender Reifung der Retikulozyten *in vitro* gelten Retikulozytenmessungen als instabil (Buttarelli et al., 2001).

In der Humanmedizin werden Retikulozytenzählungen von gekühlten Blutproben bis zu 48 Stunden nach der Blutentnahme als stabil betrachtet (Voss et al., 2008).

In der eigenen Studie steigen die Retikulozytenzahlen bei 22°C bereits nach 6 bis 12 Stunden, bei 4°C nach 36 Stunden an. Ein Anstieg der Zahlen konnte auch in der Studie von Meyer festgestellt werden. Meyer konnte durch eine mikroskopische Untersuchung der Blutaussstriche nach 72-stündiger Lagerung zeigen, dass es sich hierbei um Lagerungsartefakte handelte (Meyer, 2005). In Meyers Studie stellten sich die bei Raumtemperatur gelagerten Blutproben im Bezug auf die Retikulozyten deutlich konstanter dar. Die bei Raumtemperatur gemessenen Proben fallen zunächst in der Retikulozytenzahl ab, nach 72 Stunden steigen sie um 50 bis 100% im Vergleich zu den Ausgangswerten. Die eigenen Messungen können dies nicht bestätigen. Die kühl gelagerten Proben sind wie auch in der Humanmedizin deutlich konstanter und weichen auch nach 72 Stunden geringer vom Ausgangswert ab als ungekühlte Proben.

Zusammenfassend kann der XT-2000iV für Einsendelabors als geeignet bezeichnet werden. Wichtig ist eine korrekte Lagerung der Proben bei Kühlschranktemperatur. Auf Grund von Abweichungen des Differentialblutbildes sollten die Messungen innerhalb von 36 Stunden abgeschlossen sein. Allerdings ist bereits ab einem Zeitpunkt von 12 bis 24 Stunden mit einem Anstieg des Hämatokrits zu rechnen. Für die Thrombozytenanalyse ist eine sofortige Messung optimal.

Der Lagerungsversuch wird mit denselben Blutproben für den pochH-100iV Diff durchgeführt. Die Parameter RBC, HGB, HCT, MCV, MCH und MCHC schneiden

ähnlich ab wie beim XT-2000iV. Auf Grund von Abweichungen einiger Messungen (auf den Diagrammen erkennbar) zu den Zeitpunkten 3h und 12h sind im Vergleich zum XT-2000iV vermehrt signifikante Unterschiede auffällig. Da die Abweichungen auf den Datenreporten nicht als fehlerhaft zu identifizieren sind, werden diese „Ausreißer“ nicht aus den Daten gestrichen. Eine Ursache für diese Abweichungen kann nicht gefunden werden. Bezüglich der Gesamtleukozytenzahl und des Differentialblutbildes können auf Grund von zahlreichen Fehlermeldungen keine statistischen Daten erhoben werden.

### 5.8 Gerätebedienung

Sowohl der pochH-100iV Diff als auch der XT-2000iV sind hinsichtlich ihrer Handhabung einfach und verständlich aufgebaut. Die längere Messdauer des pochH-100iV Diff spiegelt sich nicht als Nachteil wieder, da der Benutzer in dieser Zeit nicht bei dem Gerät bleiben muss und sich anderweitig beschäftigen kann. Der schnellere Messzyklus ist vor allem bei einem Gerät für Einsendelabore, wie der XT- 2000iV, von Vorteil.

Die Blutvolumina, die von den einzelnen Geräten für eine Messung benötigt werden, sind sehr unterschiedlich. Diesbezüglich benötigt der ADVIA 2120 die größte Menge. Da man es in der Tiermedizin oft mit kleinen Patienten zu tun hat, bei denen man teilweise mit einer geringen Blutprobenmenge auskommen muss, ist ein geringes benötigtes Blutprobenvolumen wünschenswert. Der pochH-100iV Diff hat mit 15 µl das geringste Ansaugvolumen. Allerdings muss bei Entnahme von geringen Mengen auch der negative Effekt der Antikoagulanzen auf die Probe berücksichtigt werden.

Die Fehlermeldungen auf Grund von technischen Problemen sind verständlich und anhand der Anweisungen, die der Anwender durch die Bedienungsanleitung erhält, gut behebbar. Größere technische Komplikationen sind während der Messungen nicht aufgefallen.

### 6 Zusammenfassung

#### **Ziel der Studie**

Ziel der vorliegenden Studie ist die Evaluation des Sysmex XT-2000iV, einem Großlaborgerät und des Sysmex pochH-100iV Diff, einem Hämatologiesystem für die Anwendung in der Praxis.

#### **Material und Methoden**

Zur Untersuchung werden EDTA-antikoagulierte Blutproben von 208 Katzen, die innerhalb von vier bis sechs Stunden verarbeitet werden, herangezogen. Als Vergleichsmethode dienen der ADVIA 2120, der Zentrifugenhämatokrit und eine manuelle Differenzierung von 200 Leukozyten. Ein Blutausstrich zur Retikulozytenzählung (Zählung von insgesamt 1000 Erythrozyten) dient als Vergleich zur gemessenen Retikulozytenzahl. Zusätzlich erfolgen eine Bestimmung der Linearität und Verschleppung, ein Antikoagulanzevergleich sowie ein Blutlagerungsversuch über 72 Stunden mit gekühlten und ungekühlten Blutproben. Für alle drei Geräte wird eine Präzisionsmessung innerhalb einer Serie zur Berechnung der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten durchgeführt. Die lineare Regression, der Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$ , die Passing-Bablok Regression sowie die Bland-Altman Analyse (errechnet mittels Microsoft Excel „Analyse-it“ (Version 2.04)) dienen zur statistischen Auswertung des Methodenvergleichs.

#### **Ergebnisse**

Die Bestimmung der Präzision ergibt bezüglich des Variationskoeffizienten der Blutzellzählung sehr gute bis gute Werte zwischen 0,31% und 7,62%. Der schlechte Variationskoeffizient (118,62%) der Thrombozytenzählung des pochH-100iV Diff ist daher auffällig, muss jedoch im Zusammenhang mit der bekannten Problematik einer Limitation der Impedanztechnologie zur Bestimmung von Katzenthrombozyten gewertet werden. Betrachtet man die Blutzelldifferenzierung, liegen die Variationskoeffizienten zwischen 1,18% und 13,05%. Der Linearitätsversuch ergibt zufrieden stellende Ergebnisse.

Im Methodenvergleich XT-2000iV mit ADVIA 2120 der Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC, MCV, PLT werden Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen

## 6. Zusammenfassung

---

1 und 0,37 erreicht. Die Mittelwertunterschiede betragen  $0,18 \times 10^9/l$  für WBC,  $0,46 \times 10^{12}/l$  für RBC,  $-1,72 \text{ mmol/l}$  für HGB,  $0,00 \text{ l/l}$  für HCT,  $-0,26 \text{ fmol/l}$  für MCH,  $-7,25 \text{ mmol/l}$  für MCHC,  $2,58 \text{ fl}$  für MCV,  $3,8 \times 10^9/l$  für PLT. Bezüglich der Thrombozyten ist trotz niedrigem Mittelwertunterschied eine weite Streuung der 95%igen Übereinstimmungsgrenze auffällig. Betrachtet man die „slope“ Werte, fallen proportionale Fehler im Vergleich von RBC, HGB, HCT, MCH, MCV und PLT auf.

Im Vergleich poCH-100iV Diff mit ADVIA 2120 der Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC, MCV, PLT liegen die Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen 0,96 und 0,32. Es werden folgende Mittelwertunterschiede erzielt:  $0,71 \times 10^9/l$  für WBC,  $0,30 \times 10^{12}/l$  für RBC,  $-1,81 \text{ mmol/l}$  für HGB,  $0,00 \text{ l/l}$  für HCT,  $-0,25 \text{ fmol/l}$  für MCH,  $-6,62 \text{ mmol/l}$  für MCHC,  $1,53 \text{ fl}$  für MCV,  $48,0 \times 10^9/l$  für PLT. Hinzu kommt eine weite Streuung der 95%igen Übereinstimmungsgrenze der PLT. Proportionale Fehler sind hier bei RBC, HGB und dessen Indizes sowie PLT auffällig.

Betrachtet man die Ergebnisse der Differentialblutbilder sind im manuellen Vergleich für die Geräte XT-2000iV, poCH-100iV Diff und ADVIA 2120 Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen 0,92 und 0,44, sowie Mittelwertunterschiede von  $-4,34$  bis  $-3,88\%$  für neutrophile Granulozyten,  $1,67$  bis  $5,68\%$  für Lymphozyten,  $0,74$  bis  $2,74\%$  für Monozyten,  $0,05$  bis  $0,89\%$  für eosinophile Granulozyten und  $-6,15$  für OTHR ermittelt worden.

Die Retikulozytenzählungen des XT-2000iV fallen im Vergleich zum ADVIA 2120 und zur manuellen Methode höher aus.

Im Antikoagulanzenvergleich besteht ein signifikanter Unterschied in der MCHC- (EDTA und Heparin) Lymphozyten- (EDTA, Heparin und Citrat) und Monozytenzählung (EDTA und Heparin) beim XT-2000iV und des MCV (EDTA, Heparin und Citrat) beim poCH-100iV Diff.

In Betrachtung der Lagerungszeit und -temperatur erweisen sich WBC, RBC, HGB, MCH stabil. HCT, MCV und MCHC werden durch eine Anschwellung der Erythrozyten beeinflusst. Die Thrombozytenzahl ist instabil und steigt bereits nach einer dreistündigen Lagerungszeit an. Die bei  $4^\circ\text{C}$  gelagerten Blutproben stellen sich im Allgemeinen stabiler dar.

### **Schlussfolgerung**

Im Gesamtbild stellen sich die Hämatologiesysteme als geeignet für den Routinebetrieb dar. Die Abweichungen der Hämoglobinwerte und dessen Indizes sind auf Grund eines proportionalen Fehlers des ADVIA 2120 zu begründen. Möglicher Weise sind die proportionalen Fehler der RBC, des HCT und des MCV Folge der technologischen Unterschiede der Geräte. Eine tierartspezifische Softwareadaptation ist somit notwendig und bereits erfolgt. Die Thrombozytenzählung stellt auf Grund der Aggregationsneigung bei der Katze ein präanalytisches Problem dar, so dass weiterhin bei klinisch entscheidenden Werten stets eine Schätzung und Verifizierung mittels Blutaussstrich bei Katzen durchgeführt werden sollte.

Zur Auswertung des Differentialblutbildes sollte beim XT-2000iV das Scattergramm hinzugezogen werden. Dies sollte als Hilfestellung zur Erkennung von pathologischen Blutproben verwendet werden. Letztendlich ist eine Verifizierung mittels Blutaussstrich unumgänglich. Die Aussage des Differentialblutbildes bei einem Impedanzgerät (pocH-100iV Diff) ist in Frage zu stellen und bedarf ebenfalls einer manuellen Verifizierung.

Eine Retikulozytenanalyse ist hinsichtlich der Anämieklassifikation von Vorteil. Auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der manuellen Methode und des ADVIA 2120/120 sind weitere Studien zur Bestimmung von gerätespezifischen Cut-off-Werten erforderlich.

Der XT-2000iV stellt sich als Einsendegerät geeignet dar. Insgesamt sollten die Proben kühl gelagert und die Messung sollte 36 Stunden nach der Blutentnahme abgeschlossen sein. Für die Hämatokrit- und Thrombozytenbestimmungen sind frühere Analysen erforderlich.

### 7 Summary

#### Objective

The aim of this study is the evaluation of the laboratory instrument Sysmex XT-2000iV and the instrument pocH-100iV Diff for in-clinic use.

#### Material and methods

208 EDTA-anticoagulated blood samples of cats are measured within four to six hours after blood withdrawal. For comparative studies the ADVIA 2120, the spun-PCV, and a 200-cell manual differential is used. Reticulocytes are compared with a 1000-cell manual count. Additionally linearity, carry over, anticoagulation effects, and storage effect over 72 hours with samples stored at 4°C and 22°C are evaluated.

A precision study is used for calculation of standard deviation and coefficient of variation.

Linear regression, Spearman's correlation coefficient, Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis (calculated with Microsoft Excel "Analyse-it" (Version 2.04)) are used for statistical evaluation of method comparison.

#### Results

The coefficient of variation (CV) of the precision studies range between 0.31 % and 7.62%. The CV of the platelet count of the pocH-100iV Diff was 118.62 %. CV's in leukocyte differential count range between 1.18 % and 13.05 %.

The results of the linearity experiment are good.

In method comparison of the XT-2000iV with the ADVIA 2120 the Spearman correlation coefficients range between 1 and 0.37 for WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC, MCV, and PLT. Biases are  $0.18 \times 10^9/l$  for WBC,  $0.46 \times 10^{12}/l$  for RBC, -1.72 mmol/l for HGB, 0.00 l/l for HCT, -0.26 fmol/l for MCH, -7.25 mmol/l for MCHC, 2.58fl for MCV, and  $3.8 \times 10^9/l$  for PLT. In spite of the low bias the range of the 95% limits of agreement for PLT is high. Proportional errors are noticeable for RBC, HGB, MCH, MCV, and PLT.

In comparison of the pocH-100iV Diff with the ADVIA 2120 Spearman correlation coefficients for WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC, MCV, and PLT range between 0,96 and 0,32. Biases are  $0.71 \times 10^9/l$  for WBC,  $0.30 \times 10^{12}/l$  for RBC, -1.81 mmol/l for

## 7. Summary

---

HGB, 0.00 l/l for HCT, -0.25 fmol/l for MCH, -6.62 mmol/l for MCHC, 1.53 fl for MCV, and  $48.0 \cdot 10^9/l$  for PLT. Additionally a high range of the 95% limits of agreements for PLT and proportional errors for RBC, HGB, its indices, and PLT are noticed.

Regarding the results of differential count for XT-2000iV, pocH-100iV Diff and ADVIA 2120 in comparison with manual differential the Spearman correlations coefficients range between 0.92 and 0.44 and the biases range between -4.34 and -3.88% for neutrophil granulocytes, between 1.67 and 5.68% for lymphocytes, between 0.74 and 2.74% for monocytes, between 0.05 and 0.89% for eosinophil granulocytes, and -6.15 for OTHR.

A positive proportional bias for reticulocyte counting for the XT-2000iV compared with ADVIA 2120/120 and the manual method is observed.

Comparing anticoagulants, a significant difference is detected for MCHC (EDTA and Heparin) lymphocytes (EDTA, Heparin and Citrate) and monocytes (EDTA and Heparin) (XT-2000iV) and for MCV (EDTA, Heparin and Citrate) (pocH-100iV Diff).

Regarding time and temperature of storage WBC, RBC, HGB, and MCH are stable. HCT, MCV and MCHC are influenced by erythrocyte swelling. Thrombocyte counts are unstable and are already rising after 3 hours of storage. More stable results are received by storage at 4°C.

### Conclusion

In general the evaluated instruments are adequate for laboratory and in-clinic use. The proportional biases for HGB, MCH, and MCHC are caused by the measurements with the ADVIA 2120 as shown in other studies. Proportional biases of RBC, HCT, and MCV are possibly the result of different technologies of the instruments which make a software-adaptation for each different species essential. A new and species specific software adaptation is necessary and was therefore already created. The results for PLT-counts are not sufficiently accurate for both instruments, but this error is classified as a preanalytic error as a result of frequent platelet aggregation in cats. Verification using a blood smear is recommended in feline blood samples for clinically important values.

Leukocyte differential values should be interpreted with caution. Additional scattergram and blood smear interpretation is essential.

## 7. Summary

---

Reticulocyte analysis is very useful in classification of anemic patients. Because of the positive proportional bias further studies are recommended for evaluation of an instrument specific cut-off value.

Regarding the variability of results during storage, measurements should be finished within 36 hours after blood sampling. For HCT and PLT analysis faster termination is required.



### 8 Abkürzungen

BASO	Basophile Granulozyten
CBC	Zellzählung (Complete blood count)
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EO	Eosinophile Granulozyten
FSC	Vorwärtsstreuung (Foreward Scatter)
HCT	Hämatokrit
HFR	Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil (High fluorescence ratio)
HGB	Hämoglobin
ICSH	International Council for Standardization of Hematology
IPF	Unreife Thrombozyten (immature platelet fraction)
IRF	Fraktion unreifer Retikulozyten (immature reticulocyte fraction)
LFR	Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil (low fluorescence ratio)
LUC	Große Peroxidase-negativ gefärbte Zellen (large unstained cells)
LYMPH/LYM	Lymphozyten
MCHC	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	Mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume)
MFR	Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil (middle fluorescence ratio)
MONO	Monozyten
MPC	Mittlere innere Bestandteile der Thrombozyten (mean platelet component)
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (mean platelet volume)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

## 8. Abkürzungen

---

NEUT	Neutrophile Granulozyten
OTHR	Neutrophile Granulozyten + Monozyten (Abkürzung für Others)
P	Signifikanz
PCT	Plateletkrit
PCV	Hämatokrit (packed cell volume)
PDW	Thrombozyten Volumenverbreitungsbreite (platelet distribution width)
P-LCR	Anteil großer Thrombozyten (platelet large cell ratio)
PLT	Thrombozyten (platelets)
PLT-O	Fluoreszenz-optisch gemessene Thrombozyten
R	Korrelationskoeffizient
RBC	Erythrozyten (red blood cells)
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width)
RDW-CV	red cell distribution width, coefficient of variation
RDW-SD	red cell distribution width, standard deviation
RET	Retikulozyten
Retic	Retikulozyten
reticCHCM	cell hemoglobin concentration mean of reticulocytes
reticHDW	hemoglobin concentration distribution width of reticulocytes
reticMCV	mean corpuscular volume of reticulocytes
reticRDW	red cell distribution width of reticulocytes
RNA	Ribonucleinsäure
$r_s$	Spearman Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SFL	Seitwärtsfluoreszenz
SLS	Sodiumlaurylsulfat
SSC	Seitwärtsscatter
WBC	Leukozyten (white blood cells)



### 9 Anhang

Alle Grafiken zu den statistischen Analysen (Spearman`s Korrelatonskoeffizient, Lineare Regression, Passing-Bablok-Regression, Bland-Altman- Analyse) sind im Anhang als CD beigelegt.

#### 1) Sysmex poch-100iV Diff

##### 1.1)Vergleich mit ADVIA 120

- \*HGB-Bland Altman
- \*HGB-Linear Regression
- \*HGB-Passing-Bablok
- \*HGB-Spearman
- \*MCH-Bland Altman
- \*MCH-Linear Regression
- \*MCH-Passing-Bablok
- \*MCH-Spearman
- \*MCHC-Bland Altman
- \*MCHC-Linear Regression
- \*MCHC-Passing-Bablok
- \*MCHC-Spearman

##### 1.2) Vergleich mit ADVIA 2120

- \*HGB-Bland Altman
- \*HGB-Linear Regression
- \*HGB-Passing-Bablok
- \*HGB-Spearman
- \*MCHC-Bland Altman
- \*MCHC-Linear Regression
- \*MCHC-Passing-Bablok
- \*MCHC-Spearman
- \*MCH-Bland Altman
- \*MCH-Linear Regression
- \*MCH-Passing-Bablok
- \*MCH-Spearman
- \*MCV-Bland Altman
- \*MCV-Linear Regression
- \*MCV-Passing-Bablok
- \*MCV-Spearman
- \*PLT-Bland Altman
- \*PLT-Linear Regression
- \*PLT-Passing-Bablok
- \*PLT-Spearman
- \*RBC-Bland Altman
- \*RBC-Linear Regression
- \*RBC-Passing-Bablok
- \*RBC-Spearman
- \*WBC-Bland Altman

- \*WBC-Linear Regression
- \*WBC-Passing-Bablok
- \*WBC-Spearman

### 1.3) Manueller Vergleich

- \*Eo%-Bland Altman
- \*Eo%-Linear Regression
- \*Eo%-Passing-Bablok
- \*Eo%-Spearman
- \*HCT-Bland Altman
- \*HCT-Linear Regression
- \*HCT-Passing-Bablok
- \*HCT-Spearman
- \*Lymph%-Bland Altman
- \*Lymph%-Linear Regression
- \*Lymph%-Passing-Bablok
- \*Lymph%-Spearman
- \*OTHR%-Bland Altman
- \*OTHR%-Linear Regression
- \*OTHR%-Passing-Bablok
- \*OTHR%-Spearman

## 2.) Sysmex XT-2000iV

### 2.1) Vergleich mit ADVIA 120

- \*HGB-Bland Altman
- \*HGB-Linear Regression
- \*HGB-Passing-Bablok
- \*HGB-Spearman
- \*MCHC-Bland Altman
- \*MCHC-Linear Regression
- \*MCHC-Passing-Bablok
- \*MCHC-Spearman
- \*MCH-Bland Altman
- \*MCH-Linear Regression
- \*MCH-Passing-Bablok
- \*MCH-Spearman

### 2.2) Vergleich mit ADVIA 2120

- \*HGB-Bland Altman
- \*HGB-Linear Regression
- \*HGB-Passing-Bablok
- \*HGB-Spearman
- \*MCHC-Bland Altman
- \*MCHC-Linear Regression
- \*MCHC-Passing-Bablok
- \*MCHC-Spearman
- \*MCH-Bland Altman

- \*MCH-Linear Regression
- \*MCH-Passing-Bablok
- \*MCH-Spearman
- \*MCV-Bland Altman
- \*MCV-Linear Regression
- \*MCV-Passing-Bablok
- \*MCV-Spearman
- \*PLT-Bland Altman
- \*PLT-Linear Regression
- \*PLT-Passing-Bablok
- \*PLT-Spearman
- \*RBC-Bland Altman
- \*RBC-Linear Regression
- \*RBC-Passing-Bablok
- \*RBC-Spearman
- \*Reticulocytes%-Bland Altman
- \*Reticulocytes%-Linear Regression
- \*Reticulocytes%-Passing-Bablok
- \*Reticulocytes%-Spearman
- \*Reticulocytes absolute-Bland Altman
- \*Reticulocytes absolute-Linear Regression
- \*Reticulocytes absolute-Passing-Bablok
- \*Reticulocytes absolute-Spearman
- \*WBC-Bland Altman
- \*WBC-Linear Regression
- \*WBC-Passing-Bablok
- \*WBC-Spearman

### 2.3) Manueller Vergleich

- \*Eosinophiles-Bland Altman
- \*Eosinophiles-Linear Regression
- \*Eosinophiles-Passing-Bablok
- \*Eosinophiles-Spearman
- \*HCT-Bland Altman
- \*HCT-Linear Regression
- \*HCT-Passing-Bablok
- \*HCT-Spearman
- \*Lymphocytes-Bland Altman
- \*Lymphocytes-Linear Regression
- \*Lymphocytes-Passing-Bablok
- \*Lymphocytes-Spearman
- \*Monocytes-Bland Altman
- \*Monocytes-Linear Regression
- \*Monocytes-Passing-Bablok
- \*Monocytes-Spearman
- \*Neutrophiles-Bland Altman
- \*Neutrophiles-Linear Regression
- \*Neutrophiles-Passing-Bablok
- \*Neutrophiles-Spearman
- \*Reticulocytes%-Bland Altman

- \*Reticulocytes%-Linear Regression
- \*Reticulocytes%-Passing-Bablok
- \*Reticulocytes%-Spearman
- \*Reticulocytes absolute-Bland Altman
- \*Reticulocytes absolute-Linear Regression
- \*Reticulocytes absolute-Passing-Bablok
- \*Reticulocytes absolute-Spearman

## 10 Literaturverzeichnis

1. **Bauer, N. und Moritz, A. (2008)**  
Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses.  
Vet Clin Pathol 37(2):173-9.
2. **Becker, M. (2007)**  
A comparative study of seven in-house and two laboratory hematology instruments (Dissertation, Giessen).
3. **Becker, M., Moritz, A. und Giger, U. (2008)**  
Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers.  
Vet Clin Pathol 37(4):373-84.
4. **Bland, J. M. und Altman, D. G. (1999)**  
Measuring agreement in method comparison studies.  
Stat Methods Med Res 8(2):135-60.
5. **Bollinger, P.B., Drewinko, B., Brailas, C.D., Smeeton, N.A. und Trujillo, J.M. (1987)**  
The technicon H\*1--an automated hematology analyzer for today and tomorrow. Complete blood count parameters.  
Am J Clin Pathol. Jan;87(1):71-8.
6. **Briggs, C., Harrison, P. und Machin, S. J. (2007)**  
Continuing developments with the automated platelet count.  
Int J Lab Hematol 29(2):77-91.
7. **Briggs, C., Hart, D., Kunka, S., Oguni, S. und Machin, S. J. (2006)**  
Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation.  
Transfus Med 16(2):101-9.
8. **Briggs, C., Kunka, S., Pennaneach, C., Forbes, L. und Machin, S. J. (2003)**  
Performance evaluation of a new compact hematology analyzer, the Sysmex poCH-100i.  
Lab Hematol 9(4):225-33.
9. **Buttarello, M., Bulian, P., Farina, G., Temporin, V., Toffolo, L., Trabuio, E. und Rizzotti, P. (2001)**  
Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach.  
Am J Clin Pathol 115(1):100-11.
10. **Cornbleet, P. J. und Gochman, N. (1979)**



- Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis.  
Clin Chem 25(3):432-8.
11. **Dewhurst, E. C., Crawford, E., Cue, S., Dodkin, S., German, A. J. und Papasouliotis, K. (2003)**  
Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser.  
J Small Anim Pract 44(10):443-8.
  12. **Dixon, W.J. (chief editor) (1993)**  
BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
  13. **Fernandes, B. und Hamaguchi, Y. (2003)**  
Performance characteristics of the Sysmex XT-2000i hematology analyzer.  
Lab Hematol 9(4):189-97.
  14. **Fernandez, F.R. und Grindem, C.B. (2006)**  
Reticulocyte Response, in: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., Schalm's Veterinary Hematology; fifth edition.
  15. **Ferreira, H. und Freeman, K. P. (2009)**  
Instrument comparison queries.  
Vet Clin Pathol 38(3):274-6; author reply 276-9.
  16. **Freeman, K. P. und Gruenwaldt, J. (1999)**  
Quality control validation in veterinary laboratories.  
Vet Clin Pathol 28(4):150-155.
  17. **Furlanello, T., Tasca, S., Caldin, M., Carli, E., Patron, C., Tranquillo, M., Lubas, G. und Solano-Gallego, L. (2006)**  
Artifactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer.  
Vet Clin Pathol 35(1):42-6.
  18. **Goodfellow, M., Papasouliotis, K., Cue, S., Crawford, E. und Hall, E. (2008)**  
Effect of storage on microcytosis observed in dogs with portosystemic vascular anomalies.  
Res Vet Sci 84(3):490-3.
  19. **Hart, S. und Nolte, I. (1991)**  
Thrombocyte aggregation in the cat.  
Tierarztl Prax 19(4):413-8.
  20. **Hinzmann, R. (2007)**  
Die klinische Bedeutung der Bestimmung unreifer Thrombozyten.  
Sysmex Lab Info.
  21. **Houwen, B. (2003)**  
Fifty years of hematology innovation: the Coulter Principle - Retrospective.  
Medical Laboratory Observer.

22. **ICSH (1993)**  
Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulation of Blood for Blood Cell Counting and Sizing. International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry.  
Am J Clin Pathol 100(4):371-2.
23. **ICSH (1994)**  
Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. International Council for Standardization in Haematology: prepared by the ICSH Expert Panel on Cytometry.  
Clin Lab Haematol 16(2):157-74.
24. **Jensen, A. L. und Kjelgaard-Hansen, M. (2006)**  
Method comparison in the clinical laboratory.  
Vet Clin Pathol 35(3):276-86.
25. **Kieffer, J., Winkler, G., Van Hove, L., Walsh, A., Thomann, P., Wyss, S., Eggenberger, E. und Lutz, H. (2007)**  
Evaluation of the CELL-DYN® 3500 haematology instrument for the analysis of the mouse and rat blood      Comparative Hematology International.
26. **Kjelgaard-Hansen, M. und Jensen, A. L. (2006)**  
Is the inherent imprecision of manual leukocyte differential counts acceptable for quantitative purposes?  
Vet Clin Pathol 35(3):268-70.
27. **Knoll, J.S. (2006)**  
Clinical automated hematology systems, in: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., Schalm`s Veterinary Hematology; fifth edition.
28. **Koch, D. D. und Peters, Th. (2001)**  
Evaluation of methods-with an Introduction to statistical techniques in: Burtis, C.; Ashwood,E.; Tietz Fundamentals of clinical chemistry, 5th edition.
29. **Koepke, J.A., Bentley, S.A., Pierre, R.V., Richardson-Jones, A., Ross, D.W., Saunders, A.M., Simson, E., van Assendelft, O.W. und Wilding, P. (1992)**  
Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods (NCCLS Document H20-A, A Reference Method of the Evaluation of Automated Differential Counters, Based on the Visual Differential Count, Volume 12, No. 1)
30. **Kraft, W. und Dürr, U.M. (1999)**  
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 5. Auflage.
31. **Langford, K., Luchtman-Jones, L., Miller, R. und Walck, D. (2003)**  
Performance evaluation of the Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer.  
Lab Hematol 9(1):29-37.

32. **Levine, R. A., Hart, A. H. und Wardlaw, S. C. (1986)**  
Quantitative buffy coat analysis of blood collected from dogs, cats, and horses.  
J Am Vet Med Assoc 189(6):670-3.
33. **Lilliehook, I. und Tvedten, H. (2009)**  
Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts.  
Vet Clin Pathol 38(2):163-74.
34. **Lilliehook, I. und Tvedten, H. (2009)**  
Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts.  
Vet Clin Pathol 38(2):175-82.
35. **Lombarts, A. J. und de Kieviet, W. (1988)**  
Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis.  
Am J Clin Pathol 89(5):634-9.
36. **Lumsden, J.H. (2000)**  
Laboratory test method validation.  
Revue Méd. Vét., 2000, 151, 7, 623-630.
37. **Macey, M., Azam, U., McCarthy, D., Webb, L., Chapman, E. S., Okrongly, D., Zelmanovic, D. und Newland, A. (2002)**  
Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system.  
Clin Chem 48(6 Pt 1):891-9.
38. **Meinkoth, J. H. und Allison, R. W. (2007)**  
Sample collection and handling: getting accurate results.  
Vet Clin North Am Small Anim Pract 37(2):203-19, v.
39. **Meyer, K. (2005)**  
Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA 120 bei der Tierart Katze (Dissertation, Giessen).
40. **Mischke, R., Deniz, A. und Weiss, J. (1995)**  
Automatic cell counting in cat blood.  
Dtsch Tierarztl Wochenschr 102(11):435-40.
41. **Moritz, A. (2000)**  
Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin (Habilitationsschrift, Giessen).
42. **Moritz, A. und Hoffmann, C. (1997)**  
Thrombozytenzählung bei der Katze.  
Tierärztliche Praxis, Ausgabe K 25:695-700.

43. **Moritz, A., Walcheck, B. K. und Weiss, D. J. (2005)**  
Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease.  
Am J Vet Res 66(2):325-9.
44. **Motulsky, H. (2003)**  
Graph pad prism version 4.0 Statistics guide: statistical analysis for laboratory and clinical researchers.
45. **NCCLS (1996)**  
Evacuated tubes and additives for blood specimen collection, 4th ed.; approved standard. NCCLS Document H1-A4.
46. **Neuerer, F.F. (2005)**  
Evaluation des vollautomatischen Hämatologiegerätes CELL-DYN 3500 im klinischen Einsatz bei Hund und Katze (Dissertation, München).
47. **Norman, E. J., Barron, R. C., Nash, A. S. und Clampitt, R. B. (2001)**  
Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell Counts.  
Vet Clin Pathol 30(3):124-132.
48. **Pankraz, A., Bauer, N. und Moritz, A. (2009)**  
Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs.  
Vet Clin Pathol 38(1):30-8.
49. **Passing, H. und Bablok, W. (1983)**  
A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I.  
J Clin Chem Clin Biochem 21(11):709-20.
50. **Petrie, A. und Watson, P. (2006)**  
Statistics for veterinary and animal science, second edition.
51. **Roleff, S., Arndt, G., Bottema, B., Junker, L., Grabner, A. und Kohn, B. (2007)**  
Clinical evaluation of the CA530-VET hematology analyzer for use in veterinary practice.  
Vet Clin Pathol 36(2):155-66.
52. **Rümke, C. L., Bezemer, P. D. und Kuik, D. J. (1975)**  
Normal values and least significant differences for differential leukocyte counts.  
J Chronic Dis 28(11-12):661-8.
53. **Rümke, C.L. (1960)**  
Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears.  
Triangle. 1960 Jan;4:154-158.

54. **Schaefer, D. M., Priest, H., Stokol, T., Goldstein, R. E. und Belcher, N. (2009)**  
Anticoagulant-dependent in vitro hemagglutination in a cat.  
Vet Clin Pathol 38(2):194-200.
55. **Stockham, S.L. und Scott, M.A. (2008)**  
Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, second edition.
56. **Stokol, T. und Erb, H. N. (2007)**  
A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs.  
Vet Clin Pathol 36(2):148-54.
57. **Suchfort, Ch. (1998)**  
Die automatische Blutzellzählung und -differenzierung mit dem Technicon H\*1 bei der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozyten und der Erythrozytenmorphologie bei Anämien; (Differtation, Giessen).
58. **Sysmex (2005)**  
Schulungsunterlagen.
59. **Sysmex (2005)**  
Sysmex XT-2000iV/XT-1800iV, Instructions for use.
60. **Sysmex (2006)**  
Sysmex pocH-100iV Diff, Instructions for use.
61. **Sysmex (2008)**  
Customer information, software-info XT-IV series software version 00-09.
62. **Sysmex (2008)**  
pocH-100iV Diff Specifications.  
(Product Training FDC 3500i and pocH-100iV Diff, March 3-5, 2008, Norderstedt).
63. **Tvedten, H. (1993)**  
Advanced hematology analyzers interpretation of results.  
Vet Clin Pathol 22(3):72-80.
64. **Vives Corrons, J. L., Van Blerk, M., Albareda, S., Gutierrez, G., Heller, S., Nordin, G., Skitek, M., Deom, A., Horvath, K., De la Salle, B. und Libeer, J. C. (2006)**  
Guidelines for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part II: survey preparation, statistical evaluation and reporting.  
Clin Chem Lab Med 44(8):1039-43.
65. **von Rücker, A., Henkel, E., Haeckel, R., Diem, H., Müller, H.A.G., Nebe, T., Weber, R., Jönsson, D., Heller, S., Brüggemann, M., Fink, P., Kalous, J., Katz, N., Kutzner, M., Lenz, T., Lips, H., Müller, W., Pick, K.H., Pinto, G.,**

- Prohaska, W., Raffael, A., Reinecke, T., Rothe, G., Ruby, C., Sachse, C., Seeger, H.T., Schmitz, G., Schneider, W., Strorawa, F., Van Wersch, J.W.J. und Ziervogel, H. (1994)**  
Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte.  
Klinische Chemie Mitteilungen, 25, 272-286.
66. **Voss, S. C., Flenker, U., Majer, B. und Schanzer, W. (2008)**  
Stability tests for hematological parameters in antidoping analyses.  
Lab Hematol 14(3):24-9.
67. **Wegemann, D. (1998)**  
Fallbeispiele zum QBC-Vet Autoread, aus: Dissertation Zürich, (Evaluation von QBC-Vet Autoread, VETTEST 8008 und VetLyte als Laboreinheit in der veterinärmedizinischen Praxis).
68. **Weissert, D., Becker, M. und Moritz, A. (2008)**  
Anämieklassifikation bei Hunden mittels durchflusszytometrischer Retikulozytenanalyse verglichen mit herkömmlichen Methoden (RI, RPI).  
Abstract Jahreskongress der DGK-DVG, Duesseldorf, Germany, 25–28 Sept 2008;579–580.
69. **Westgard, J. O. (1995)**  
A method evaluation decision chart (MEDx chart) for judging method performance.  
Clin Lab Sci 8(5):277-83.
70. **Westgard, J.O. (2003)**  
Basic Method Validation, 2nd Edition.
71. **Zelmanovic, D. und Hetherington, E. J. (1998)**  
Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state.  
Vet Clin Pathol 27(1):2-9.

### 11 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Moritz für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Für die fachliche Beratung und Unterstützung danke ich Dr. Melanie Ginder, Herrn Manfred Wöhlert, Dr. Tanja Tornow und der Firma Sysmex Europe GmbH.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Martina Stirn und Dr. Natali Bauer für die Hilfestellung bezüglich der statistischen Analysen so wie für die fachliche Unterstützung.

Dr. Klaus Failing und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biomathematik danke ich für die statistische Auswertung meiner Daten.

Ein herzlicher Dank geht an das Team im Zentrallabor und an Frau Ingrid Klein, die mich bei der Messung der Proben kräftig unterstützt haben.

Ein weiteres Dankeschön an alle Kollegen der Klinik für Kleintiere, die mir während dieser Zeit bei Seite gestanden und mir beim Sammeln der Blutproben geholfen haben.

Für die Zusammenarbeit, Unterstützung sowie gegenseitige Motivation während den Tagen, an denen wir gemeinsam Blutproben auf Hundeplätzen, bei Katzenzüchtern und in Pferdeställen gesammelt und anschließend gemessen haben möchte ich Cathrin Dunker und Deborah Weissert danken.

Für den seelischen Beistand, aufmunternden Worte und für seine Hilfe bei der Schreibearbeit am Computer danke ich Thorsten Förnges.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Freunden bedanken, deren Unterstützung während des Studiums und der Dissertation unersetzlich waren.

## Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Julia Nakagawa, 2010





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5600-1



9 783835 956001